

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Nikolina Bičanić

PRIMJENA SUVREMENIH TEHNOLOŠKIH POSTUPAKA U OSIGURAVANJU  
STABILNOSTI SUHIH PRAŠKASTIH OBLIKA PROBIOTIKA

Specijalistički rad

Zagreb, 2018.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: doc. dr. sc. Ivan Pepić

Specijalistički rad obranjen je dana 5. travnja 2018. u Zagrebu na Farmaceutsko –  
biokemijskom fakultetu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Anita Hafner

2. doc. dr. sc. Ivan Pepić

3. doc. dr. sc. Donatella Verbanac

Rad ima 54 lista.

## **PREDGOVOR**

Tema specijalističkog rada je aktualna i korisna s obzirom da opisuje različite tehnološke metode i čimbenike koji utječu na stabilnost i kakvoću probiotika. Budući da je već dobro poznata korisnost bakterija iz roda *Lactobacillus*, stanovnika životinjskog i ljudskog probavnog sustava, danas se ove bakterije sve više koriste u preventivne i terapijske svrhe. Detaljan opis čimbenika koji utječu na stabilnost / vijabilnost probiotika tijekom njihove obrade do suhih praškastih oblika, pridonijeti će i boljem razumijevanju i daljnjem razvoju suvremenih tehnoloških metoda obrade probiotika.

Specijalističkim radom su pregledani svi relevantni članci, od općih do specijaliziranih na analitički i kritički način kako bi se obradila problematika ovoga rada.

Izbor literaturnih podataka je sveobuhvatan i sadrži listu publikacija koje su relevantne za odabranu temu. Tema specijalističkog rada je obrađena temeljem najnovijih spoznaja iz predmetnog područja.

Najljepše zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Ivanu Pepiću na strpljenju, pruženoj pomoći, utrošenom vremenu te konstruktivnim savjetima tijekom pisanja rada.

Veliko hvala mojoj obitelji što su imali strpljenja tijekom moga dodatnog obrazovanja.

## **SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja:**

Cilj specijalističkog rada je opisati različite tehnološke metode i čimbenike koji utječu na stabilnost i kakvoću probiotika. Glavna područja koja će biti obrađena su tehnologije sušenja, uključujući sušenje zamrzavanjem i sušenje raspršivanjem, zaštitna sredstva, uključujući stres, fazu rasta i medija, uvjete čuvanja probiotika i rehidraciju.

### **Materijal i metode:**

Kao materijal za izradu specijalističkog rada obrađena je dostupna literatura prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pretraženi su opći i specijalizirani članci relevantni za problematiku ovog specijalističkog rada, proučeni na analitički i kritički način s obzirom na definiranje znanstvenog i / ili stručnog problema. Također je provedeno istraživanje postojećih znanja o definiranom problemu kao i oblikovanje radne hipoteze te odabir metoda za njeno ispitivanje. Pri proučavanju relevantnih članaka izdvojeni su najvažniji rezultati, rasprave i zaključci. Na temelju proučavanih članaka izvedena su vlastita razmatranja proučavane problematike koja su sastavni dio rasprave rada.

### **Rasprava:**

Rezultati prikazani u brojnim radovima potvrđuju da procesi sušenja utječu na integritet stanica i na stanične membrane. Visoki gubitak kultiviranja uvijek odgovara visokom porastu propusnosti stanica. To potvrđuje ulogu integriteta membrane u bakterijskoj kultiviranosti i veliku korelaciju između takva dva markera održivosti.

Utvrđeno je da različiti procesi sušenja snažno utječu na probiotičku održivost i funkcionalnost. Učinci dehidracijskih postupaka na funkcionalnost stanica nisu izravno povezani s preživljavanjem stanice, a svaki bakterijski soj ima specifičnu osjetljivost na svaku od stabilizacijskih metoda. Također je otkriveno da postupci sušenja mogu pozitivno ili negativno mijenjati svojstva bakterija. Sušenje zamrzavanjem dalo je najbolju metodu očuvanja bakterijske kulture, hidrofobnosti i enzimske aktivnosti, ali je uzrokovalo značajno kašnjenje rasta. Sušenje raspršivanjem je relativno jeftina tehnologija, brza i ponovljiva u usporedbi s drugim tehnikama mikrokapsuliranja. Proces je fleksibilan, nudi znatne varijacije u matrici, može se prilagoditi i proizvodi čestice dobre kvalitete.

### **Zaključak:**

Fermentirani i nefermentirani mliječni proizvodi obogaćeni probiotičkim bakterijama su se razvili u uspješnu kategoriju funkcionalne hrane, te je u tom smislu izuzetno bitna stabilnost i dostupnost suhih praškastih oblika probiotika za njihovu raširenu primjenu.

Metode proizvodnje suhih probiotičkih oblika trebaju biti takve da održavaju i osiguravaju stabilnost te odgovarajući broj bakterija nakon proizvodnje. Metode sušenja zamrzavanjem i sušenja raspršivanjem mogu se koristiti za proizvodnju suhih praškastih oblika probiotika u velikim količinama, ali ti procesi rezultiraju izlaganjem živih probiotičkih bakterija različitim stresnim uvjetima, kao što su toplina, hladnoća, kisik i osmotski stres, što može rezultirati smanjenom funkcionalnošću i gubitkom stabilnosti tijekom sušenja i skladištenja.

## **SUMMARY**

### **Objectives:**

The aim of this specialist work was to describe the different technologies and factors affecting the stability and quality of probiotics. The main areas that will be covered are drying technology, including freeze-drying and spray drying, protective equipment, including stress, stage of growth and media, conditions of probiotics storage and rehydration.

### **Material and methods:**

As a material for the development of specialist work, available studies were used according to case studies, relevant authors and journals. General and specialized articles, relevant to the issues of this work are searched, examined on analytical and critical manner with regard to the definition of the scientific and / or technical problems. Research of existing knowledge about defined problem as well as the design of a work hypothesis and the selection of methods for its examination were also carried out. Based on the study articles, self-reflection of the issues studied will be carried out, which will also be an integral part of the discussion.

### **Discussion:**

The results shown in numerous scientific works confirm that drying processes affect cell integrity and cell membranes. The high loss of cultivation always corresponds to high cell viability. This confirms the role of membrane integrity in bacterial cultivation and a great correlation between these two sustainability markers. It was found that various drying processes strongly influence probiotic sustainability and functionality. The effects of

dehydration treatments on cell function are not directly related to survival of the cell and each bacterial strain has a specific sensitivity to each of the stabilizing methods. It has also been found that drying processes can alter positively or negatively the properties of bacteria. Freeze drying has provided the best method for preserving bacterial cultivation, hydrophobicity and enzymatic activity, but has caused a significant delay in growth. Spray drying is relatively inexpensive technology, fast and repeatable compared to other microencapsulation techniques. The process is flexible, offers substantial variations in the matrix, can be adjusted and produces good quality particles.

### **Conclusion:**

Fermented and non-fermented dairy products enriched with probiotic bacteria have evolved into a successful category of functional foods and in that sense is extremely important stability and availability of solid dosage forms of probiotics to their widespread use. The methods of producing dry probiotic forms should be such as to maintain and ensure stability and an adequate number of bacteria after production. Methods of freeze drying and spray drying can be used to produce dry powder form of probiotics in large quantities, but these processes result in the exposure of living probiotic bacteria to different stresses, such as heat, cold, oxygen and osmotic stress, which can lead to reduced functionalities of this loss stability during drying and storage.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>1</b>
1.1. OPĆENITO O PROBIOTICIMA .....	2
1.2. TEHNOLOŠKI ZAHTEVI PRI IZBORU PROBIOTIKA .....	3
1.3. KRITERIJI ZA ODABIR PROBIOTIČKOG SOJA U RAZVOJU PROBIOTIČKE HRANE NAMIJENJENE ZA LJUDSKU POTROŠNJU ....	6
1.4. REZISTENCIJA BAKTERIJA NA ANTIBIOTIKE U PROBIOTICIMA - SIGURNOSNI PROBLEM .....	7
1.5. MEHANIZMI ANTIBIOTIČKE REZISTENCIJE U PROBIOTICIMA.....	8
1.6. RAZVOJ PROBIOTIČKE HRANE.....	9
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....</b>	<b>12</b>
3.1. OSNOVNI PRINCIPI SUVREMENIH TEHNIKA IZRADE SUHIH OBLIKA PROBIOTIKA.....	12
3.1.1 <i>Mikrokapsuliranje probiotičkih bakterija .....</i>	<i>12</i>
3.1.2 <i>Liofilizacija probiotičkih bakterija.....</i>	<i>17</i>
3.1.3 <i>Sušenje raspršivanjem.....</i>	<i>21</i>
3.2. SREDSTVA ZA ZAŠTITU PRI PROCESIMA SUŠENJA.....	25
3.3. SREDSTVA ZA ZAŠTITU PRI POHRANI .....	26
3.4. OVISNOST USPJEŠNOSTI SUŠENJA O UVJETIMA UZGOJA PROBIOTIČKIH BAKTERIJA .....	29
3.4.1 <i>Primjena blagog stresa prije procesa dehidracije .....</i>	<i>29</i>
3.4.2 <i>Utjecaj pH i sadržaja kisika na rast probiotičkih bakterija .....</i>	<i>29</i>
3.4.3 <i>Mediji za uzgoj .....</i>	<i>33</i>
3.5. REHIDRACIJA.....	34
3.6. PAKIRANJE PROIZVODA .....	35
3.7. SKLADIŠTENJE .....	37
<b>4. RASPRAVA .....</b>	<b>39</b>



5.	ZAKLJUČAK.....	43
6.	LITERATURA .....	44
7.	ŽIVOTOPIS.....	52

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

Pod pojmom probiotik podrazumijeva se jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina. Obično se nalaze u fermentiranom mlijeku, jogurtu i siru, ali su također dostupni i u obliku dodataka prehrani. Probiotici poput vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* dodaju se hrani uglavnom za poboljšanje ravnoteže crijevne mikroflore. *Lactobacillus*, rod gram-pozitivnih fakultativnih anaerobnih bakterija, karakterizira sposobnost proizvodnje mliječne kiseline, a ima izrazito važnu ulogu u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. Budući da je već vrlo dobro poznato da su bakterije iz roda *Lactobacillus* stanovnici životinjskog i ljudskog probavnog sustava, danas se ove bakterije sve više koriste u preventivne i terapijske svrhe. *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrste su najčešće korištene za proizvodnju hrane za ljudsku potrošnju s obzirom na značajne zdravstvene prednosti povezane s uzimanjem takvih mikroorganizama. Takvi mikroorganizmi dijele mnogo zajedničkih osobina, sigurni su za upotrebu, otporni na želučanu kiselinu i probavne enzime te imaju sposobnost zadržavanja na stanicama crijeva. Probiotičke kulture koje se koriste u prehrani najčešće su proizvedene u smrznutom ili praškastom obliku, ili procesom zamrzavanja ili sušenjem. Uspješno sušenje vrsta *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* objavljeno je za nekoliko različitih sojeva, uključujući *Lactobacillus paracasei*. Adekvatno rješenje za poboljšanje preživljenja takvih sojeva u probiotičkim pripravcima tijekom njihove obrade je tehnološki postupak uklapanja u mikrokapsule. U svrhu produljenja stabilnosti probiotika tijekom skladištenja, koriste se različite tehnike kao što su sušenje raspršivanjem, liofilizacija i oblaganje raspršivanjem.

Liofilizacija ili sušenje proizvoda u zamrznutom obliku postupak je sušenja kojim se tekući dio materijala nakon smrzavanja odvodi sublimacijom. Liofilizacijom (engl. „freeze-drying“) se izbjegava denaturacija uzrokovana zagrijavanjem proizvoda na način da ga se održava u zamrznutom obliku tijekom postupka sušenja. Prednosti postupaka liofilizacije uključuju smanjenje kontaminacije, minimalno oštećenje i gubitak aktivnosti kod termolabilnih materijala, brzinu i cjelovitost rehidracije, mogućnost točnog i sterilnog doziranja konačnih proizvoda u spremnike.

### 1.1. Općenito o probioticima

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne bakterije (s niskim sadržajem gvanina i citozina u molekuli DNA) koje su prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijali te u ljudskom probavnom sustavu. To su industrijski vrlo važni mikroorganizmi koji se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda, a sve je učestalija primjena bakterija mliječne kiseline kao probiotika ili u kombinaciji s prebioticima (sinbiotički koncept). Probiotici su definirani kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi ili životinja, blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući mu svojstva autohtone mikroflore (Šušćković, 1996). Da bi izazvali željene pozitivne učinke na zdravlje, probiotički pripravci moraju sadržavati žive mikrobne stanice u koncentracijama višim od  $10^6$  /g proizvoda. Zbog toga se istražuju različite metode koje mogu pridonijeti povećanju njihovog preživljavanja tijekom biotehnološke proizvodnje, čuvanja ili primjene probiotika u različitim proizvodima te nakon oralne primjene u probavnom sustavu domaćina. Mnogi znanstveni radovi opisuju utjecaj različitih metoda mikrokapsulacije na povećanje stabilnosti i preživljavanja probiotika tijekom njihove proizvodnje i primjene, a kao

najpogodnija metoda pripreme bakterijskih stanica kroz duži vremenski period često se navodi liofilizacija (Capela i sur., 2006; Gbassi i sur., 2009).

## **1.2. Tehnološki zahtjevi pri izboru probiotika**

Za proizvodnju suhih praškastih oblika probiotika koja osigurava dulji vijek trajanja u odnosu na tekuće proizvode, najveći izazov je svladati gubitak stabilnosti uslijed uklanjanja vode, izloženosti kisiku te na kraju visoke temperature tijekom sušenja. Nadalje, stabilnost proizvoda treba biti osigurana tijekom čitavog perioda trajanja koje je uvjetovano i fizikalnim parametrima te uvjetima skladištenja. U većini slučajeva gubitak stabilnosti tijekom skladištenja više je izražen nego tijekom obrade. Poboljšanje stabilnosti suhih praškastih oblika može se postići npr. upotrebom zaštitnih sredstava / uklapanjem materijala u mikrokapsule, primjenom blagih okolišnih naprezanja tijekom ili nakon fermentacije. Dehidracija se često primjenjuje kao metoda stabilizacije probiotika za njihovo olakšano skladištenje, transport i kasniju primjenu. Na stabilnost probiotika u prehrambenim proizvodima utječu različiti faktori počevši od uvjeta fermentacije pa sve do pakiranja i skladištenja (Slika 1).

Liofilizacija je najraširenija tehnika dehidracije probiotika i mliječnih proizvoda. Tijekom zamrzavanja, formiranje izvanstaničnog leda uzrokuje povećanje izvanstanične osmolalnosti, stoga odmah nakon oblikovanja leda izvan stanica nastupa njihova dehidracija. Različiti krioprotektori, odnosno lioprotektori dodaju se u medij prije provedbe samog postupka liofilizacije kako bi se povećalo preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom faze dehidracije. Takva zaštitna sredstva podrazumijevaju obrano mlijeko u prahu, proteine sirutke, trehalozu, glicerol, betain, adonitol, saharozu, glukozu, laktozu i polimere poput dekstrana i polietilenglikola. Akumulacijom kompatibilnih krioprotektora unutar stanica smanjuje se razlika u osmotskom tlaku između

unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora. Proizvodnja probiotika u praškastom obliku mora se izvoditi na način kojim će se održati adekvatan broj živih stanica. Upotreba zaštitnih sredstava je dobro poznata strategija povećanja tolerancije sušenih probiotičkih sojeva. Međutim, također treba uzeti u obzir potencijalni utjecaj krio / lioprotektora na fiziologiju bakterijskih stanica. Uvjeti skladištenja kao što su temperatura skladištenja, sadržaj vlage, relativna vlažnost, sadržaj kisika, izlaganje svjetlu i skladištenje materijala mogu imati značajne utjecaje na stabilnost suhih praškastih oblika probiotika te su pravilni uvjeti skladištenja neophodni za osiguravanje održive populacije različitih oblika probiotika. Rehidracija probiotičkih pripravaka ključan je korak za oživljavanje stanica nakon dehidracije. Veliki udio probiotičkih bakterija može biti i uništen ovisno o procesu rehidracije. Rehidracija sama po sebi (u smislu osmolarnosti, pH i izvora energije), kao i uvjeta rehidracije (u smislu temperature rehidracije i volumena) može značajno utjecati na vrijeme preživljenja, i na taj način utjecati i na izgled preživljavanja. U svijetu je naširoko izražena zabrinutost za kakvoću probiotičkih proizvoda. Proizvod koji sadrži probiotičke organizme treba sadržavati određeni broj živih stanica da bi bio učinkovit ( $>10^6 - 10^8$  CFU / g, ili  $> 10^8 - 10^{10}$  CFU / danu) te su objavljene i brojne studije o probiotičkim bakterijama u višim ili nižim dozama. U svakom slučaju sadržaj živih stanica u probiotičkom proizvodu presudan je u ocjeni njegove kakvoće.

Mnoge studije pokazuju da proizvodi na tržištu ne sadrže navedene koncentracije probiotičkih sojeva ili da su neki u neprihvatljivo niskim količinama. Takvi podaci ukazuju na to da stabilnost probiotičkih bakterija u komercijalno dostupnim proizvodima (npr. mikrokapsulirane kulture, smrznuti koncentрати, kapsule, hrana i piće) može biti veliki problem te ukazuje na potrebu za njihovom boljom kontrolom. Nažalost dokazivanje određenih bakterija često zahtijeva specijalizirane i standardizirane metodologije koje nisu utvrđene za mnoge probiotičke sojeve.

S obzirom na činjenicu da probiotičke stanice moraju biti žive kada se konzumiraju, analiza kultura je kritična u utvrđivanju kakvoće (broja živih stanica) probiotičkih proizvoda.

Budući da su probiotičke stanice često pod stresom zbog različitih čimbenika vezanih za njihovu proizvodnju, preradu i formulaciju, standardna metodologija ima tendenciju podcjenjivati broj stanica u tim proizvodima. Uklapanjem probiotika u mikrokapsule postiže se stabilizacija stanica tj. poboljšava njihova aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Postupak uklapanja u mikrokapsule pridonosi dodatnoj zaštiti stanica laktobacila i bifidobakterija tijekom procesa rehidracije i liofilizacije.

Procesiranje funkcionalne hrane i mikroorganizama prisutnih u njoj može se podijeliti u tri osnovne kategorije:

- a) procesiranje starter kultura
- b) procesiranje probiotika
- c) procesiranje proizvoda da bi se postigla željena funkcionalna svojstva (Fonden i sur., 2000).



Slika 1. Utjecaj različitih faktora na stabilnost probiotika (Tripathi i Giri, 2014)

### 1.3. Kriteriji za odabir probiotičkog soja u razvoju probiotičke hrane namijenjene za ljudsku potrošnju

Vrsta *Lactobacillus* se najčešće koristi i predstavlja važan dio flore humanog crijeva, a kada je prisutna u dovoljnom broju stvara zdravu ravnotežu između korisnih i štetnih potencijalnih mikrobiota u probavnom sustavu (Dunne i sur., 2001). Osnovni uvjet za probiotike koje proizvodi trebaju sadržavati su određeni broj mikroorganizama do isteka roka valjanosti (Fasoli i sur., 2003). Međutim, kako bi oni zadržali funkcionalne osobine i zdravstvene prednosti, potreban je veliki napor za izbor probiotičkog soja. Kriteriji za izbor bakterija mliječne kiseline u svrhu uporabe kao „Probiotički” uključuju slijedeće: (a) pokazuju blagotvoran učinak na domaćina, (b) prisutne su u prehrambenim proizvodima u određenim količinama te ostaju održive tj. vijabilne tijekom čitavog roka trajanja proizvoda, (c) imaju stopu preživljenja prolaskom kroz probavni sustav, (d) čvrsto prijanjaju na epitelne stanice, (e) imaju antagonističku aktivnost spram karcinogenih i patogenih bakterija, (f) stabiliziraju intestinalnu mikrofloru i pružaju različite zdravstvene prednosti, (g) stabilni su na žučne kiseline, enzime i kisik, (i) sigurnosne značajke koje uključuju nepatogene, netoksične, nealergijske, nemutagene učinke (Mattila i Saarela, 2000; Parvez i sur, 2006; Tumola i sur., 2001). Na temelju tih kriterija, probiotički soj treba biti pomno odabran za održavanje stabilnosti tijekom komercijalne proizvodnje probiotika, a pregled najčešće korištenih bakterija mliječne kiseline u probiotičkim proizvodima prikazan je u tablici 1. Osim toga, ovi sojevi trebali bi biti metabolički aktivni u probavnom sustavu te biološki učinkoviti. Dakle, izbor otpornih probiotičkih sojeva tijekom proizvodnje, skladištenja i prolaska kroz probavni sustav je od primarne važnosti. Većina današnjih probiotika izabrana je upravo analizom i korištenjem takvih kriterija. Dakle, važno je imati na umu da svaki probiotički soj ima svoja specifična svojstva, a

idealni sojevi moraju imati uspostavljene i zdravstvene i sigurnosne podatke iz randomiziranih kontroliranih kliničkih ispitivanja (Lee i Salminen, 2009; Ventura i Perozzi, 2011).

Tablica 1. Najčešće korištene bakterije mliječne kiseline u probiotičkim proizvodima (Tripathi i Giri, 2014)

<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii ssp.</i> , <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i>
<i>Bifidobacterium sp.</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. longum</i>
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i>

#### 1.4. Rezistencija bakterija na antibiotike u probioticima - sigurnosni problem

Probiotici se smatraju sigurnima, ali ipak postoje određeni problemi povezani sa sigurnošću njihove primjene. Postoje uglavnom tri teorije koje se odnose na sigurnost probiotika: (1) na pojavu bolesti, kao što su endokarditis, bakterijemije ili; (2) otrovni ili metabolički učinci na probavni sustav; i (3) prijenos antibiotika i otpornost na floru probavnog sustava (Snydman, 2008). Dostupni epidemiološki podaci, kliničke studije i studije toksičnosti preporučuju da se LAB obično koristi u fermentiranim namirnicama te se većina današnjih probiotika smatra sigurnim za primjenu. Organizmi koji se općenito smatraju sigurnim su vrste *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium* i kvasci. Postoje i drugi probiotički organizmi kao što su *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* i bakterije koje tvore spore, ali se ipak ne smatraju dovoljno sigurnim za prehranu ljudi, ali se koriste kao probiotici. Mnogi sojevi takvih vrsta koriste se u proizvodnji industrijske hrane bilo kao starter kulture ili kao probiotici tako da je potrebno dokazati njihovu sigurnost prije nego se stave na tržište. Čimbenici koje treba uzeti u obzir uključuju svojstva mikroba, fiziološkog



statusa potrošača, doze, kao i mogućnost da probiotička bakterija može biti potencijalni izvor antibiotske otpornosti unutar probavnog trakta (Senok i sur., 2005). Kako bi se spriječilo neželjeno prenošenje rezistencije na endogene bakterije, probiotici ne bi trebali nositi rezistenciju osim one potrebne. Postoji nekoliko metoda za procjenu sigurnosti bakterija mliječne kiseline korištenjem *in vitro* studije, studije na životinjama i kliničkih studija na ljudima koje dokazuju da probiotički sojevi ispunjavaju sigurnosne standarde. Pokrenut je i određeni broj inicijativa kako bi se provjerila otpornost na antibiotike iz starter kultura i probiotičkih mikroorganizama. Probiotici se unose u velikim količinama u funkcionalnu hranu, a prisutnost antibiotika u genomu se mora i sustavno prikazati. Dakle, prehrambena industrija mora pažljivo procijeniti sigurnost i učinkovitost svih novih vrsta i probiotičkih sojeva prije nego ih se stavi u proizvodnju prehrambenih proizvoda.

### **1.5. Mehanizmi antibiotske rezistencije u probioticima**

Globalno širenje otpornosti na antibiotike je sve više važan klinički i javnozdravstveni problem u svijetu. Zbog velike upotrebe antibiotika u proteklih nekoliko godina značajnu ulogu ima pojava i raširenost rezistentnih bakterija. Antibiotika izloženost omogućuje bakterijama da razviju mehanizam za prevladavanje antimikrobnih učinaka, a jedan bakterijski soj može posjedovati i nekoliko vrsta mehanizama rezistencije.

Mehanizam, odnosno način probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline, može biti izražen kroz tri glavna aspekta: A) inhibicijom rasta nepoželjnih mikroorganizama, B) modifikacijom metabolizamskih procesa u probavnom sustavu i C) stimulacijom imunološkog sustava domaćina (Šušković i sur., 1993). Međutim, uglavnom su dva mehanizma kojim bakterije postaju otporne na antibiotike. Bakterijska rezistencija na antibiotike može se postići ili kroz unutarnji ili stečeni mehanizam. Dominantni mehanizam ovisi o prirodi antibiotika, mjestu djelovanja, bakterijskoj

vrsti, o tome je li bakterijska vrsta sama ili povezana na plazmid. Postoje tri vrste rezistencije koje su uočene u LAB: unutarnja ili urođena, stečena i mutirana.

## 1.6. Razvoj probiotičke hrane

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, više od 500 probiotičkih proizvoda predstavljeno je na globalnom tržištu i ovaj popis proizvoda se stalno širi, a pregled najčešće korištenih *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta u komercijalne svrhe prikazan je u tablici 2. Probiotički prehrambeni proizvodi koji su izvedeni fermentacijom žitarica, voća i povrća (sokova, brze hrane, rezanog voća) i mesnih proizvoda (šunke, slabine, kobasice) privlače pozornost znanstvene zajednice kao i potrošača (Gupta i Abu-Ghannam, 2012). Sir i proizvodi od sira, majoneza, proizvodi s masnoćama za namaze, kao i proizvodi od mesa, neki su od navedenih primjera probiotičke hrane razvijene u nedavnoj prošlosti. Probiotički organizmi su također komercijalno dostupni u mlijeku, kiselim vrhnju, voćnim sokovima, sladoledu, energetskim pločicama i proizvodima na osnovi zobi. Većina pripravaka kultura su komercijalno dostupne u visokoj koncentraciji i većina njih je pripravljena za izravnu primjenu (Kallasapathy, 2013), bilo za visoke koncentracije zamrznutih kultura ili u obliku liofiliziranih prašaka. Korištenje takvih koncentriranih kultura od strane proizvođača hrane je uobičajeno jer je vrlo teško razmnožavati probiotičke mikroorganizme na proizvodnoj lokaciji. Zamrznute kulture sadrže više od  $10^{10}$  CFU / g, dok liofilizirane kulture sadrže više od  $10^{11}$  CFU / g (Tripathi i Giri, 2014). Okus i aromu prehrambenih proizvoda moguće je promijeniti dodatkom probiotika zbog proizvodnje različitih metaboličkih komponenti poput octene kiseline koju proizvodi *Bifidobacterium spp.* tijekom fermentacije i tijekom perioda pohrane proizvoda. Dodatkom probiotičke kulture prehrambenom proizvodu ne smije se štetno djelovati na kvalitetu proizvoda ili na njegove senzorne karakteristike (Mohammadi i Mortzavian, 2011).

Tablica 2. Popis najčešće korištenih *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta u komercijalne svrhe (Tripathi i Giri, 2014)

Proizvođač / Proizvod	Vrsta
Chr. Hansen	<i>L. acidophilus</i> LA1 / LA5 <i>L.debrueckii ssp. bulgaricus</i> Lb12 <i>L. paracasei</i> CRL431 <i>B. animalis ssp. lactis</i> Bb12
Danisco	<i>L. acidophilus</i> NCFMs <i>L. acidophilus</i> La <i>L. paracasei</i> Lpc <i>B. lactis</i> HOWARUTM / BI
DSM Food Specialties	<i>L. acidophilus</i> LAFTIs L10 <i>B. lactis</i> LAFTIs B94 <i>L. paracasei</i> LAFTIs L26
Nestle	<i>L. johnsonii</i> La1
Snow Brand Milk	<i>L. acidophilus</i> SBT - 20621 <i>B.longum</i> SBT -29281
Institut Rosell	<i>L. rhamnosus</i> R0011 <i>L. acidophilus</i> R0052
Yakult	<i>L. casei</i> Shirota <i>B. breve</i> soj Yaku
Fonetera	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10) <i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)
Probi AB	<i>L. plantarum</i> 299V <i>L. rhamnosus</i> 271
Danone	<i>L. casei</i> Immunitas <i>B. animalis</i> DN173010
Essum AB	<i>L. rhamnosus</i> LB21 <i>Lactococcus lactis</i> L1A
Biogaia	<i>L. reuteri</i> SD2112
Morinaga Milk Co.Ltd	<i>B. longum</i> BB536
Laboratorij Lacteol	<i>L. acidophilus</i> LB
Medipharm	<i>L. paracasei</i> L19

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj specijalističkog rada je opisati različite tehnološke metode i čimbenike koji utječu na stabilnost i kakvoću probiotika. Glavna područja koja će biti obrađena su tehnologije sušenja, uključujući sušenje zamrzavanjem (liofilizacija) i sušenje raspršivanjem, zaštitna sredstva, stres, fazu rasta i medija, uvjete čuvanja probiotika i rehidraciju.

### **3. MATERIJAL I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI**

Kao materijal za izradu specijalističkog rada obrađena je dostupna literatura prema temi i predmetu istraživanja, autorima i časopisu. Pretraženi su opći i specijalizirani članci relevantni za problematiku ovog specijalističkog rada, proučeni na analitički i kritički način s obzirom na definiranje znanstvenog i / ili stručnog problema, istraživanja postojećih znanja o definiranom problemu kao i oblikovanje radne hipoteze te odabir metoda za njeno ispitivanje.

#### **3.1. Osnovni principi suvremenih tehnika izrade suhih oblika probiotika**

##### **3.1.1 Mikrokapsuliranje probiotičkih bakterija**

Danas je u svijetu velika potražnja za proizvodima na bazi probiotika koji se najčešće koriste i konzumiraju u obliku fermentiranih mliječnih proizvoda te kao dodaci prehrani (Champagne i Fustier, 2007). Međutim, učinkovitost probiotika ovisi o broju živih bakterijskih stanica u proizvodu budući da probiotičke bakterije moraju zadržati aktivnost tijekom skladištenja, a nakon oralne primjene preživjeti prolazak kroz želudac i tanko crijevo gdje glavnu prepreku preživljenju čine želučana kiselina, prisutni enzimi i žučne soli. Analize probiotičkih proizvoda u različitim zemljama diljem svijeta potvrdile su da broj živih stanica probiotičkih sojeva u fermentiranim mliječnim proizvodima nije uvijek zadovoljavajući (Shah, 2000; Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001). Isto tako, probiotički proizvodi u obliku tableta, prašaka i sl. moraju sadržavati točno određeni broj živih stanica probiotičkih mikroorganizama tijekom roka trajanja proizvoda. Dakle, važno je osigurati optimalne uvjete tijekom pripreme i čuvanja probiotika (sastav hranjive podloge, temperatura rasta, trajanje fermentacije, miješanje, homogenizacija itd.) radi mikrobiološke stabilnosti proizvoda.

Dodatkom različitih zaštitnih tvari, uklapanjem u mikrokapsule tijekom zamrzavanja, sušenja ili čuvanja, može se bitno povećati broj živih stanica po gramu pripravka (Anal i Singh, 2007; Champagne i Fustier, 2007). Uspostavljanje fizičke barijere između živih stanica probiotičkih mikroorganizama i nepovoljnih vanjskih uvjeta novi je koncept od sve veće važnosti. Do sada su se mikroorganizmi imobilizirali u svrhu njihove primjene s ciljem dobivanja različitih biotehnoloških proizvoda. Zadržavanje stanica unutar matriksa olakšalo je separaciju stanica od njezinih metabolita. Uklapanjem u mikrokapsule postiže se stabilizacija stanica tj. poboljšava njihova aktivnost i stabilnost tijekom proizvodnje, skladištenja i korištenja. Postupak uklapanja u mikrokapsule pridonosi i dodatnoj zaštiti stanica laktobacila i bifidobakterija tijekom procesa rehidracije i liofilizacije. Mikrokapsuliranje je proces oblikovanja zaštitnog sloja oko neke žive ili nežive materije koja je u potpunosti sadržana unutar stijenke kapsule kao jezgra kapsuliranog materijala, za razliku od imobilizacije gdje se imobilizirana materija može nalaziti izvan ili unutar matriksa. Do uklapanja u mikrokapsule može doći i prirodnim putem i to tijekom rasta bakterijskih stanica koje proizvode egzopolisaharide. Međutim, većina bakterija mliječne kiseline koje sintetiziraju egzopolisaharide ne proizvode dovoljno egzopolisaharida za samostalno i potpuno uklapanje vlastitih stanica materije u mikrokapsule (Shah, 2002). Mikrokapsula odvaja probiotičke vrste od okoliša sve do njihovog oslobađanja. Njome se ujedno i zaštićuje nestabilna materija od njezinog okoliša čime se poboljšava njezina stabilnost i aktivnost tijekom skladištenja te omogućava ravnomjerno i kontrolirano oslobađanje. Stijenka mikrokapsule se formira pomoću sredstva za mikrokapsulaciju oko sirovine sadržane u jezgri mikrokapsule, štiti jezgru te dozvoljava prolaz manjim molekulama (Franjone i Vasishtha, 1995; Gibbs i sur., 1999). Kemijski sastav i struktura stijenke obično utječe na funkcionalna svojstva mikrokapsula (Hegenbart, 1993).

Od svih sredstava za mikrokapsuliranje, najčešće se koristi kalcijev alginat zbog jednostavnosti primjene, netoksičnosti, biokompatibilnosti i niske cijene (Krasaekoopt i sur., 2004). Alginat je

linearni heteropolisaharid D - manuronske i L - guluronske kiseline, ekstrahiran iz različitih vrsta algi. Funkcionalna svojstva alginata kao potpornog materijala u algama su izuzetno povezana sa strukturom i sekvencijom L - guluronske i D - manuronske kiseline. Divalentni kationi poput  $\text{Ca}^{2+}$  vežu se na polimer L - guluronske kiseline u alginatu (Krasaekoopt i sur., 2003). Kapsule mogu biti različite veličine i varirajućih oblika (Franjione i Vasishta, 1995). Mikro kapsula se sastoji od semipermeabilne, sferične, tanke i čvrste membranske stijenke. Za uklapanje u mikro kapsule mogu se upotrijebiti i drugi „*food-grade*“ polimeri poput kitozana, karboksimetilceluloze, karagenana, želatine ili pektina (Anal i Singh, 2007). Uz primjenu biopolimera, kao zaštitno sredstvo mogu se dodati proteini sirutke budući da su biorazgradivi, a mogu se primijeniti u različitim tipovima namirnica. Rezultati *in vivo* studija dokazali su da proteini sirutke dodani pri mikrokapsuliranju probiotičkih stanica u alginatu poboljšavaju preživljavanje probiotičkih sojeva u probavnom sustavu domaćina.

Mikrokapsuliranje se može provesti i pomoću enzima transglutaminaze (Heidebach i sur., 2009). Enzim transglutaminaza katalizira reakciju između g-karboksiamidne skupine peptida ili proteina vezanih glutaminskih ogranaka i primarnih amina. Kada transglutaminaza djeluje na proteinske molekule one se međusobno povezuju i polimeriziraju preko  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lizin veze (Kuraishi i Sakamoto, 1997). Membrana služi kao fizički otpor oslobađanju stanica i minimalizira mogućnost kontaminacije. U kapsuliranom obliku probiotičke bakterije su zaštićene od djelovanja bakteriofaga i nepovoljnih uvjeta kao što su npr. niska pH vrijednost želuca ili niska temperatura (Krasaekoopt i sur., 2003). Sirovine u jezgri mikro kapsule oslobađaju se različitim mehanizmima kao npr. mehaničkom rupturom stijenke kapsule, otapanjem stijenke, fuzijom stijenke i difuzijom materijala (Franjione i Vasishta, 1995).

Otapanje alginata uz odvajanje kalcijevih iona i oslobađanju stanica unutar humanog probavnog sustava gdje je potrebno ciljano probiotičko djelovanje, još je jedna od prednosti mikrokapsuliranih

probiotskih bakterija. Postupcima mikrokapsuliranja biti će moguće dostaviti konzumentima vijabilne sojeve probiotskih bakterija u velikom broju. Predviđa se da će mikrokapsuliranje moći poslužiti za združenu inkapsulaciju prebiotskih supstrata i probiotskih bakterija u istim mikrokapsulama kako bi se postigao pojačani sinbiotski učinak nakon oslobađanja u probavnom sustavu (Kailasapathy, 2002). Postoji nekoliko različitih tehnika uklapanja u mikrokapsule obzirom na razne prilagodbe i specifičnosti, kao što su vrsta mikrokapsule (veličina i oblik), kemijska i fizikalna svojstva spoja, vrsta pripravaka s kontroliranim oslobađanjem i naravno opseg proizvodnje. Najvažnije korištene tehnike su: emulgiranje, koacervacija, sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem. Unatoč tome što postoje različite tehnike, sušenje raspršivanjem se najčešće koristi zbog niske cijene, raspoložive opreme i učinkovitosti. U posljednjih nekoliko godina se najčešće primjenjuju hitin i kitozan te njihovi derivati, njih više od 200.

Glavni razlozi za veću primjenu takvih prirodnih sirovina su svojstva poput biokompatibilnosti i biorazgradivosti (Aranaz i sur., 2009). Kitozan nudi širok raspon jedinstvenih primjena u prehrambenoj industriji, uključujući i čuvanje hrane od mikrobnog kvarenja te formiranje biorazgradivih filmova i mikrokapsula. Kitozan-glukoza kompleks je razvijen kao konzervans za razne formulacije hrane, uz svoja antioksidacijska svojstva i antimikrobno djelovanje.

Kitozan se također široko koristi u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji kao suvremeni nosač lijekova, a može se koristiti kao potpora za imobilizaciju enzima, te je posebno korišten kao nosač u procesima uklapanja u mikrokapsule za kontrolirano oslobađanje bioaktivnih spojeva.



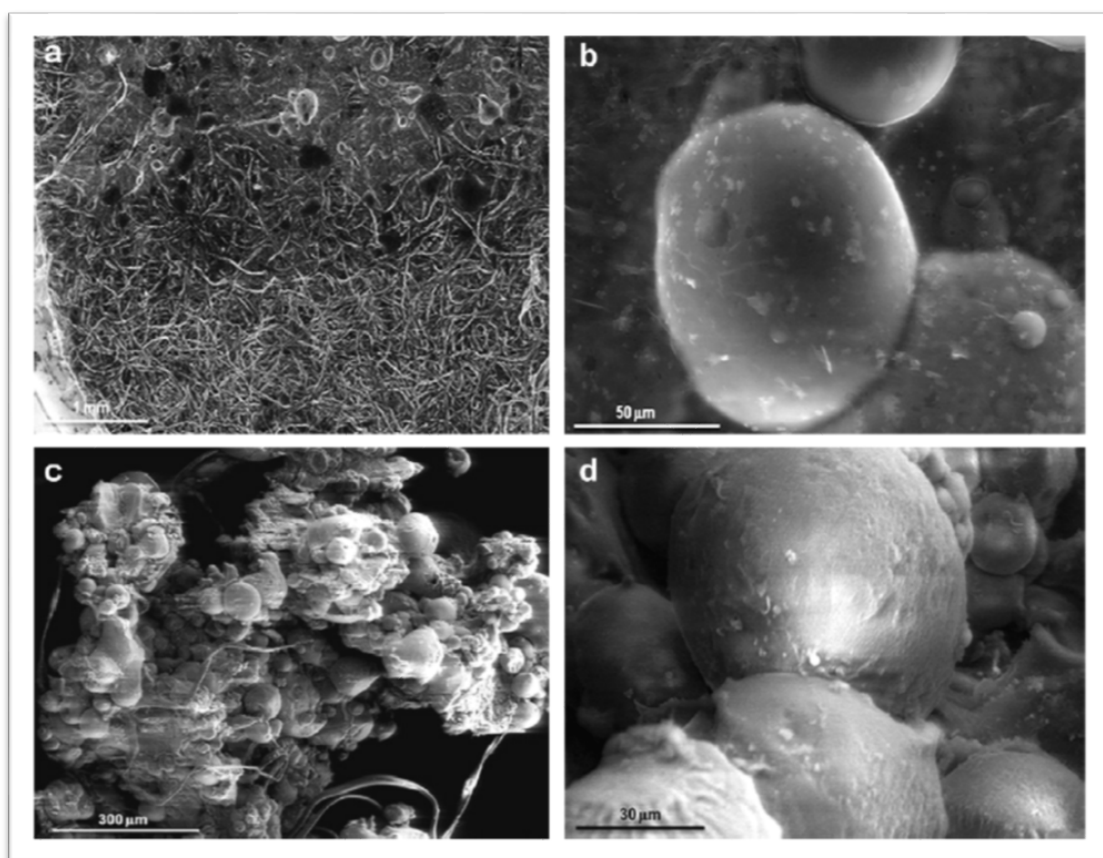
### *Kitozan*

Hitin je po svojoj strukturi sličan fibrinu; vrsta polimera u linearnom lancu i sastoji se od 1000 do 3000 N-monoacetil-glukoznih jedinica. Kitozan je deacetilirani hitin, tj. sirovina koja se dobiva deacetilacijom hitina. Kitozan se može smatrati netoksičnom i jeftinom sirovinom, a kako posjeduje reaktivne amino-funkcionalne skupine ima potencijal za primjenu u različitim područjima. (Tablica 3). Molekularna težina je ključna za definiranje viskoznosti kitozana. Stupanj deacetilacije smatra se jednim od najvažnijih karakteristika kitozana. Neki su autori objavili spoznaje da se smanjivanjem stupnja deacetilacije povećava stupanj biorazgradivosti. Jedna od zanimljivijih karakteristika kitozana je smanjivanje koncentracije kolesterola. Više je čimbenika zaslužnih za taj učinak, a jedan od njih opisuje da prisutnost amino skupina u strukturi kitozana određuje elektrostatske sile između njega i anionskih komponenti kao što su masne i žučne kiseline. Iako su hitin i kitozan vrlo atraktivne makromolekule, one nisu topljive u vodi. Kitozan je topljiv samo u kiselim otopinama zbog svoje kristalne strukture i stupnja deacetilacije, što relativno ograničava njegovu primjenu. S ciljem poboljšanja topljivosti kitozana, izrađeni su različiti derivati kitozana. Kitozan ima jednu značajnu prednost u odnosu na druge sirovine za izradu mikrokapsula, a to je mogućnost da uspostavi kovalentne ili ionske veze sa sredstvima za umrežavanje.

### 3.1.2 Liofilizacija probiotičkih bakterija

Liofilizacija ili sušenje zamrzavanjem je postupak sušenja kojim se tekući dio materijala nakon smrzavanja odvodi sublimacijom. Proces se sastoji od tri faze: smrzavanje, primarno sušenje (sublimacija) i sekundarno sušenje (desorpcija vode). Liofilizacijom (engl. „freeze-drying“) se izbjegava denaturacija uzrokovana zagrijavanjem proizvoda na način da ga se održava u zamrznutom obliku tijekom postupka sušenja. Prednosti postupaka liofilizacije uključuju smanjenje kontaminacije, minimalno oštećenje i gubitak aktivnosti termolabilnih materijala, brzinu i cjelovitost rehidracije, mogućnost točnog i sterilnog doziranja konačnih proizvoda u spremnike itd. Obzirom na veliku osjetljivost prema dehidraciji, kao i značaj bakterija mliječne kiseline (BMK) u prehrambenoj industriji, liofilizacija je preporučljiva metoda sušenja ovih bakterija, unatoč dugom vremenu sušenja, velikom utrošku energije i skupoj opremi koja liofilizaciju kao metodu sušenja opravdava samo ako se proizvode pripravci velike vrijednosti i kvalitete. Dehidracija se često primjenjuje kao metoda stabilizacije probiotika za njihovo olakšano skladištenje, transport i kasniju primjenu. Liofilizacija je najraširenija tehnika dehidracije probiotika i mliječnih proizvoda. Uvjeti obrade povezani sa sušenjem zamrzavanjem blaži su od sušenja raspršivanjem te je veća probiotička stopa preživljavanja (Wang i sur., 2004). To i Etzel (1997) pokazali su da 60-70% stanica koje su preživjele korak zamrzavanja mogu preživjeti i korak dehidracije (Iaconelli i sur., 2015). Tijekom zamrzavanja, formiranje izvanstaničnog leda uzrokuje povećanje izvanstanične osmolalnosti, stoga odmah nakon oblikovanja leda izvan stanica dolazi do dehidracije tih istih stanica. Mikroapsule *L. acidophilus* LA 2 prije i nakon sušenja zamrzavanjem snimljene pomoću skenirajućeg elektronskog mikroskopa prikazane su na slici 2. Metode zamrzavanja stanica dijele se na sporo i brzo zamrzavanje. Kod sporog zamrzavanja proces postupne dehidracije stanica i istodobnog formiranja leda na njihovoj površini može dovesti do

oštećenja samih stanica, dok se kod brzog zamrzavanja takva pojava može izbjeći kao i neravnomjerno sažimanje stanica (Fowler i Toner, 2005). Što je veći broj stanica, veće je oštećenje membrane zbog formiranja izvanstaničnih kristala leda tijekom procesa zamrzavanja (Fonseca i sur., 2000). Nadalje, veličina stanica ima veliki utjecaj na preživljavanje probiotika tijekom liofilizacije, gdje su male sferične stanice poput enterokoka rezistentnije na zamrzavanje i liofilizaciju za razliku od velikih štapićastih stanica laktobacila (Fonseca i sur., 2000).



Slika 2. *L. acidophilus* LA 2 prije sušenja zamrzavanjem (a i b), nakon sušenja zamrzavanjem (c i d) (Chen i Mustapha, 2012)

Uklanjanje vezane vode iz bakterijskih stanica tijekom sušenja može dovesti do oštećenja površinskih proteina, stanične stijenke i stanične membrane. Vezana voda je vrlo važna za stabilizaciju strukturnog i funkcionalnog integriteta bioloških makromolekula, pa uklanjanje vode tijekom sušenja vodi destabilizaciji strukturnog integriteta staničnih komponenti i uzrokuje gubitak određenih funkcija. Predloženo je da lipidni dio stanične membrane bude primarno ciljno područje za štetu tijekom sušenja, gdje može doći do peroksidacije lipida (Tripathi i Giri, 2014). Osim toga destabiliziraju se i sekundarne strukture RNA i DNA što rezultira smanjenom učinkovitošću replikacije DNA, transkripcije i translacije. Stoga, kako bi se postigli optimalni rezultati u sušenju probiotika, mora se biti fokusiran na pristupe koji osiguravaju što je moguće manja oštećenja staničnih komponenti. Zbog toga se u svrhu postizanja optimalnih rezultata tijekom sušenja probiotika, pažnja mora dobro usmjeriti na minimalizaciju oštećenja određenih staničnih komponenti.

Različiti krioprotektori, odnosno lioprotektori se dodaju u suspenziju stanica prije provedbe samog postupka liofilizacije kako bi se povećalo preživljavanje probiotičkih bakterija tijekom dehidracije. Takvi protektori podrazumijevaju obrano mlijeko u prahu, proteine sirutke, trehalozu, glicerol, betain, adonitol, saharozu, glukozu, laktozu i polimere poput dekstrana i polietilenglikola (Morgan i sur., 2006). Akumulacijom kompatibilnih krioprotektora unutar stanica smanjuje se razlika u osmotskom tlaku između unutarstaničnog i izvanstaničnog prostora (Meng i sur., 2008). Proizvodnja probiotika u praškastom obliku mora se izvoditi na način kojim će se održati adekvatan broj živih stanica. Za industrijsku proizvodnju se zbog toga često primjenjuje tehnika liofilizacije, iako se tijekom procesa žive stanice probiotičkih bakterija izlažu različitim oblicima stresa poput topline, hladnoće, osmotskog stresa, koncentracije kisika, što vodi narušavanju određenih funkcija stanica tijekom sušenja i skladištenja. Za optimalne odnosno povoljne rezultate, neophodno je provesti pravilan odabir lioprotektora (Meng i sur., 2008).

Za uspješnu liofilizaciju od primarnog je značaja postići dobar vakuum, budući da ukupan tlak unutar uređaja mora biti niži od tlaka pare na površini pripravka koji se liofilizira, a tlak para na površini kondenzora mora biti niži od tlaka para u unutrašnjosti liofilizatora. Uobičajeni vakuum koji se primjenjuje za liofilizaciju je između 50 i 100 mmHg. Pripravak koji se suši liofilizacijom tijekom sušenja prolazi kroz dvije faze: fazu primarnog sušenja i fazu sekundarnog sušenja. Primarno je sublimiranje (od -15 °C do -70 °C), tijekom kojeg se u pripravak dovodi toplina. Smatra se da je primarno sušenje završeno kad je u pripravku preostalo još 6-8 % vode, jer tada u njemu više nema leda pa je i sublimacija okončana. Primarnim se sušenjem iz pripravka izdvaja tzv. slobodna voda. Sekundarno sušenje je sušenje iz "tekućeg" stanja i njime se nastoji ukloniti tzv. vezana voda, jer je ona čimbenik koji može spriječiti uspješno čuvanje osušenog liofilizata, osobito kod sobne temperature (Runjić-Perić, 1996). Laktobacili dobro podnose zamrzavanje i čuvanje pri temperaturama do -20 °C i niže, dok slabije podnose sušenje iz zamrznutog stanja i sušenje raspršivanjem. Sastav medija ima veliki utjecaj na stabilnost bakterijskih stanica tijekom tih procesa, npr. prisutnost CaCO<sub>3</sub> u mediju u koncentraciji od 0,1 % povećava preživljavanje stanica bakterijske kulture *L. acidophilus* tijekom zamrzavanja (-20 °C), ali ne i tijekom liofilizacije. Dodatak 5 % glicerola u taj medij povećava postotak preživljavanja tijekom procesa liofilizacije. Staab i Ely (1987) dobili su bolje rezultate pri liofilizaciji anaerobnih kultura (*Bifidobacterium* i *Peptostreptococcus*) kada se koristio pepton s 12 % saharoze kao nosač bakterijskih stanica, a ne obrano mlijeko. U slučaju skladištenja bakterijskih kultura tijekom duljeg vremenskog perioda i u nepovoljnim uvjetima provodi se uklapanje stanica u mikrokapsule (Šušković, 1996).

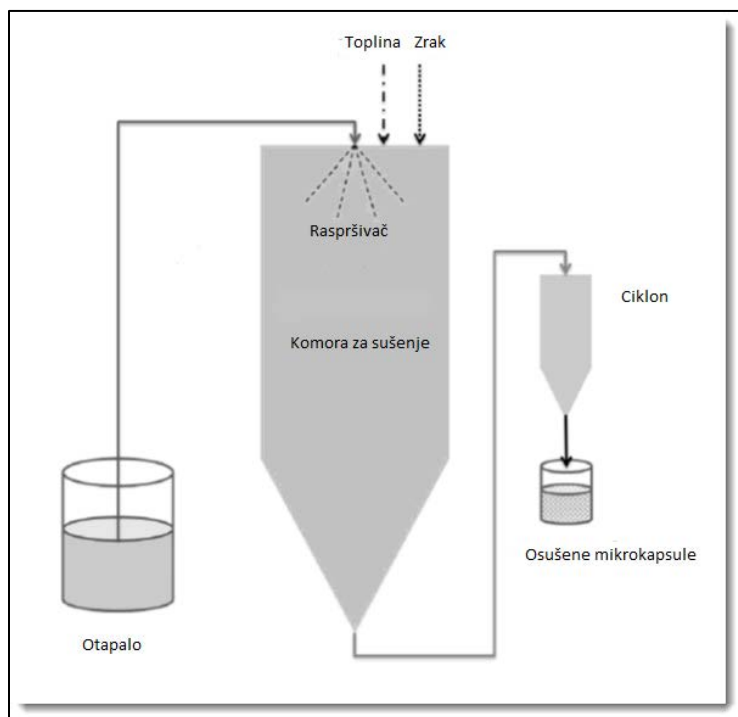
### 3.1.3 Sušenje raspršivanjem

Sušenje raspršivanjem označava tehniku raspršivanja tekućeg supstrata (otopine, emulzije ili suspenzije) u zagrijanome mediju za sušenje (npr. u zraku ili inernom plinu), koja rezultira uklanjanjem otapala i nastankom suhog proizvoda. Sušenje raspršivanjem sastoji se od tri osnovna koraka:

- a) raspršivanja uz pomoć raspršivača
- b) sušenja u struji zagrijanog zraka ili inernog plina
- c) separacije osušenih čestica (Dürriegl, 2011).

U farmaceutskoj industriji sušenje raspršivanjem primjenjuje se za izradu mikročestica za različite terapijske sustave kao što su parenteralni, nazalni, topikalni ili pulmonalni terapijski sustavi. Mnoga istraživanja pokazuju da se sušenje raspršivanjem može primijeniti za izradu suhih emulzija, sušenje fosfolipida te izradu silikatnih gel mikročestica. Veličina mikročestica izravno je određena i obilježjima raspršivača. Veličinu mikročestica, osim promjera raspršivača, određuju i tlak raspršivanja (veći tlak → manje čestice), koncentracija otopine za raspršivanje (veća koncentracija → veća viskoznost → veće kapljice / čestice) ili početna zasićenost otopljenih tvari (veća zasićenost → veće čestice) (Dürriegl, 2011). Shematski prikaz procesa sušenja raspršivanjem prikazan je na slici 3.

Komercijalna proizvodnja liofiliziranih probiotika je skupi proces s relativno niskim preživljavanjem tako da metoda sušenja raspršivanjem nudi alternativno jeftiniji pristup uz veće preživljavanje u proizvodnji praškastih oblika probiotika (Zamora i sur., 2006). Tijekom sušenja raspršivanjem bakterijske stanice su izložene toplinskom stresu, osim već spomenutim stresovima kod metode sušenja zamrzavanjem, izlaganja kisiku i osmotskom stresu (Teixeira i sur., 1997).



Slika 3. Shematski prikaz procesa sušenja raspršivanjem (Estevinho i sur., 2013)

Proces sušenja raspršivanjem na staničnoj membrani može rezultirati povećanom propusnošću stanica i posljedičnim propuštanjem unutarstaničnih komponenti iz stanice u okolinu (Teixeira i sur., 1995a). Citoplazmatska membrana je među najviše osjetljivim mjestima u bakterijskim stanicama na stres povezan sa sušenjem raspršivanjem, dok su stanične stijenke, kao i DNA i RNA također pod utjecajem, što rezultira gubitkom metaboličke aktivnosti (Teixeira i sur., 1995b; Teixeira i sur., 1997). Brojne studije pokazuju uspješne rezultate sušenja raspršivanjem raznih probiotika, a stopa preživljavanja probiotičkih kultura ovisi o različitim čimbenicima kao što su izbor probiotičkog soja, temperature i izbor sredstva za sušenje. Korištenjem rifampicin otporne vrste *Lactobacillus paracasei* NFBC 338, pokazalo se da je stopa preživljavanja > 80% što je bilo moguće postići sušenjem raspršivanjem u rekonstituiranom obranom mlijeku (RSM) pri temperaturama 85-90 °C (Gardiner i sur., 2002), dok u sličnim uvjetima (80 °C) Ananta i Knorr

(2003) objavljuju stopu preživljavanja  $> 60\%$  za *L. rhamnosus* GG. Pokazalo se da različite bakterijske vrste variraju u odnosu na toleranciju prema uvjetima sušenja raspršivanjem, naglašavajući važnost izbora soja. Na primjer soj *L. paracasei* NFBC 338 preživio je znatno bolje nego *L. salivarius* UCC 118 u sličnim uvjetima sušenja raspršivanjem (Gardiner i sur., 2000), što se može pripisati većoj toplinskoj toleranciji soja *L. paracasei* NFBC 338 u odnosu na *L. salivarius* UCC 118 (Gardiner i sur., 2000). Kada su uspoređene tolerancija na temperaturu i kisik *Bifidobacterium* vrsta tijekom sušenja raspršivanjem, utvrđeno je da se blisko srodne vrste najbolje ponašaju prilikom izlaganja visokim temperaturama i kisiku, osobito *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* koja je preživjela sušenje na 70 % ili više u RSM (20 % m/V), pri temperaturi 85-90 °C (Simpson i sur., 2005). Temperatura je glavni parametar koji utječe na broj preživjelih stanica tijekom sušenja raspršivanjem. Temperatura izravno utječe na dinamiku isparavanja otapala, što u konačnici određuje brzinu povlačenja površine kapljice te snažno utječe na morfologiju novonastalih mikročestica. Omjer ulazne i izlazne temperature vrlo je bitan parametar u optimiranju iskorištenja procesa sušenja raspršivanjem.

Naime, iskorištenje procesa raste s povećanjem temperature do određene granice zbog boljeg sušenja mikročestica (niže ostatne vlage) i smanjenog zadržavanja na stijenkama cilindra. Maksimalno se iskorištenje postiže na onoj ulaznoj temperaturi koja ne prelazi staklište smjese polimera i lijeka koji se suši (Dürriegl, 2011). Kim i Bhowmik (1990) utvrdili su da je broj bakterija *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* i *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus* smanjen s povećanjem izlazne ili ulazne temperature zraka, a slične rezultate objavili su Gardiner i suradnici (2000) i za *L. paracasei* NFBC 338 i *L. salivarius* UCC 118. Prema tome, poboljšana vijabilnost se može postići smanjivanjem izlazne temperature za vrijeme sušenja raspršivanjem, a osim vijabilnosti probiotika, održava se i kvaliteta praškastih oblika, također pod utjecajem istih, pri čemu se prednost daje proizvodima sa sadržajem vlage od 3,5% (Zayed i Ross, 2004).



*Kompetitivni procesi tijekom sušenja raspršivanjem*

Uspješno upravljanje formiranjem čestica u procesu sušenja raspršivanjem ovisi o razumijevanju i kontroli ovih kompetitivnih procesa unutar kapljice:

- a) difuzije tvari,
- b) površinske aktivnosti,
- c) topljivosti.

Difuzija tvari pojavljuje se u otopinama s više otopljenih tvari kad njihove koncentracije nisu jednake u svim dijelovima otopine. Tijekom sušenja mikrokapljice istodobno se događaju različiti difuzijski procesi, i to:

- a) transport otapala prema površini mikrokapljice,
- b) transport otopljenih tvari prema unutrašnjosti mikrokapljice.

Sila koja pokreće te difuzijske procese koncentracijski je gradijent nastao zbog isparavanja otapala i koncentriranja otopljenih tvari na površini. Brzina difuzije otopljenih tvari ovisit će o njihovoj difuzivnosti i koncentracijskom gradijentu. Ako mikrokapljice sadržavaju više otopljenih tvari, unutar njih se može dogoditi segregacija tvari ovisno o njihovim difuzijskim brzinama. Tako se na površini mikročestica mogu očekivati one komponente koje imaju najnižu difuzivnost ili najnižu topljivost. Segregacija komponenti unutar mikročestica glavna je posljedica difuzijskih procesa. Pojave segregacije u mikročestici detaljno su istraživane u preradi mlijeka tehnikom sušenja raspršivanjem, gdje je potvrđeno da najveće komponente (masnoće i proteini) dominiraju površinom i slojevima bliskim površini mikročestica osušenog mlijeka u odnosu prema, primjerice, laktozi. Ako otopina za raspršivanje sadržava površinski aktivne tvari, one prevladavaju površinom mikrokapljice nakon raspršivanja zbog svoje sklonosti adsorpciji na granici tekuće i plinske faze (Dürriegl, 2011).

Millqvist-Fureby i Smith (2007) pokazali su da nakon dodatka lecitina smjesi za sušenje on dominira površinom osušene čestice (Dürriegl, 2011).

### 3.2. Sredstva za zaštitu pri procesima sušenja

Različita sredstva za zaštitu dodaju se suspenziji stanica prije sušenja zamrzavanjem ili sušenja raspršivanjem kako bi se zadržala stabilnost probiotika tijekom dehidracije, uključujući mlijeko u prahu, proteine sirutke, trehalozu, glicerol, betain, adonitol, saharozu, glukozu, laktozu i polimere kao što su dekstran i polietilen glikol (Morgan i sur., 2006). Dodaci hrani mogu biti protektivni (imaju zaštitnu funkciju), neutralni ili mogu biti štetni na stabilnost probiotika, pri čemu kompatibilnost probiotika s različitim dodacima hrani igra ključnu ulogu kod njihovog preživljavanja. Kompatibilni krioprotektori mogu se dodati u medij prije fermentacije kao pomoć u adaptaciji probiotika na okoliš (Capela i sur., 2006), a kao rezultat toga smanjuje se osmotska razlika u stanicama. Upotreba arapske gume u mediju tijekom sušenja raspršivanjem ima za posljedicu bolji opstanak probiotika soja *L. paracasei* NFBC 338, koji je 10 puta veći nego kod kontrolne stanice (20% RSM) kada se uzgaja u smjesi RSM (10 % m/V) i arapske gume (10 % m/V) prije sušenja raspršivanjem pri temperaturi 100-105 °C (Desmond i sur., 2002).

RSM je vrlo pogodan medij za učinkovito sušenje raspršivanjem probiotičkih kultura (Ananta i sur., 2005), a obrano mlijeko proteina može spriječiti oštećenja stabiliziranjem membrane stanica. Nadalje, on može oblikovati zaštitni film na staničnoj stijenci budući da kalcij u mlijeku povećava preživljavanje nakon dehidracije. Corcoran i suradnici (2004) objavili su da uključivanjem prebiotika polidekstroze i inulina u medij (RSM) nije poboljšana stabilnost tijekom sušenja raspršivanjem ili skladištenje praškastih oblika. S druge strane, preživljavanje *L. helveticus* u vakuumu poboljšano je dodatkom 1% sorbitola (Santivarangkna i sur., 2006). Poznato je da

ugljikohidrati imaju zaštitni učinak na probiotičke bakterije tijekom sušenja zamrzavanjem, s obzirom da takve kriozaštitne tvari mogu podići temperaturu u fazi tranzicije i zato žive stanice mogu doći do staklaste faze bez nukleacije unutarstaničnog leda (Fowler i Toner, 2005). Također pokazalo se da je trehaloza učinkovito kriozaštitno sredstvo za vrijeme zamrzavanja i liofilizacije, omogućujući veće preživljavanje *L. acidophilus* (Conrad i sur., 2000) s obzirom na izuzetno visoku temperaturu staklastog prijelaza trehaloze i jakih ion-dipol interakcija i vodikovih veza između trehaloze i biomolekule. Uspoređena su kriozaštitna djelovanja niza disaharida na preživljenje *L. rhamnosus* GG tijekom liofilizacije i skladištenja te je utvrđeno da su trehaloza, trehaloza / laktoza i laktoza / maltoza najviše učinkoviti disaharidi u procesima zamrzavanja i liofilizacije (Conrad i sur., 2000).

### 3.3. Sredstva za zaštitu pri pohrani

Aditivi koji se općenito koriste u prehrambenoj industriji uključuju različite tipove šećera, zaslađivača, soli, aroma (diacetil, acetaldehid i acetoin) te prirodnih ili umjetnih zaslađivača. Takvi aditivi mogu značajno utjecati na rast i vijabilnost probiotičkih bakterija korištenih za fermentirane i nefermentirane proizvode. Visoke razine izvjesnih sastojaka mogu inhibirati rast probiotika tijekom njihove pohrane (Boylston i sur., 2004; Lee i Salminen, 2009). Sredstva za stvrdnjavanje poput natrijevog nitrita koji se obično dodaje mesnoj masi, predstavljaju izazov za probiotičke bakterije u mesu (Kolozyn-Krajewskaa i Dolatowski, 2012). Različiti promotori rasta poput glukoze, vitamina, minerala, kazeina, hidrolizata proteina sirutke, ekstrakta kvasaca i antioksidanata su dodani u mliječne proizvode kako bi potaknuli stopu rasta probiotičkih vrsta (*Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), kako je za ove vrste poznato da slabo rastu u mlijeku

(Korbekandi i sur., 2011). Takvi dodaci imaju pozitivan učinak na preživljavanje probiotičkih mikroorganizama tijekom pohrane (Mohammadi i sur., 2011).

Za izvjesne derivate proteina (koncentrat proteina sirutke, kiseli hidrolizat kazeina i triptona) je utvrđeno kako potiču rast probiotika pružajući stanicama hranjive tvari, sniženjem redoks potencijala medija kao i povećanjem kapaciteta puferiranja medija koji rezultira u malom sniženju pH vrijednosti (Mortazavian i sur., 2010). Vijabilnost *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* je poboljšano dodatkom L-cisteina, koncentrata proteina sirutke, kazeinskog hidrolizata i triptona. Kazein i hidrolizati proteina sirutke su smanjili stopu rasta probiotičkog *L. acidophilus* La 5 i *L. rhamnosus* Lr 35 u fermentiranom mlijeku tijekom etape proizvodnje, međutim preživljavanje takvih bakterija je bilo poboljšano nakon pohrane (Lucas i sur., 2004). Istraživanja su također pokazala kako prisutnost disaharida može stabilizirati staničnu membranu probiotika tijekom pohrane (Carvalho i sur., 2002; Onneby i sur., 2013). Na primjer, sorbitol sprječava oštećenje membrane interakcijom s membranom pri čemu stabilizira funkcionalnost i strukturu proteina. Linders i suradnici (1997) također su utvrdili kako je sorbitol najučinkovitije zaštitno sredstvo kod *L. plantarum* i *L. rhamnosus* tijekom pohrane, dok trehaloza nije imala zadovoljavajući zaštitni učinak. Neki od ovih spojeva, poput fruktooligosaharida i galaktooligosaharida imaju pozitivan učinak na zadržavanje vijabilnosti probiotika (osobito kod roda *Bifidobacterium*) u prehrambenim proizvodima tijekom pohrane (Rycroft i sur., 2011). Matriksi čvrstih prehrambenih proizvoda poput struktura gela u siru, podržavaju stanice probiotika smanjenjem njihovog izlaganja štetnim čimbenicima (Tripathi i Giri, 2014). Visoki udio masnoća, anaerobni okoliš i kapacitet puferiranja u siru pomaže zaštititi probiotičke stanice u proizvodu kao i tijekom prijenosa kroz probavni sustav (Lee i Salminen, 2009). Povećanje kapaciteta puferiranja mlijeka će dovesti do visoke vijabilnosti probiotika u mliječnim fermentiranim proizvodima tijekom pohrane, zbog održavanja viših pH vrijednosti. Osim navedenog, suha tvar matriksa apsorbira atome vodika, što dovodi do

koncentriranja nedisociranih organskih kiselina. Takav rezultat se ogleda u smanjenju baktericidnog učinka navedenih spojeva na probiotike (Heydari i sur., 2011; Korbekandi i sur., 2011).

Tablica 3. Najčešće korištena sredstva za mikrokapsuliranje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Estevinho i sur., 2013)

Sredstva	Prednosti	Nedostaci
Celuloza acetat ftalat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• široka primjena u industriji</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• otapa se pri pH &gt; 6</li> <li>• usporava apsorpciju lijekova</li> <li>• sintetski polimer</li> </ul>
Alginat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prirodna sirovina</li> <li>• jednostavan za rukovanje u laboratoriju</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• visoki troškovi u industriji</li> <li>• porozna i propusna membrana</li> </ul>
Arapska guma	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prikladna topljivost</li> <li>• niska viskoznost</li> <li>• glatki okus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• skupa</li> <li>• teško dostupna</li> </ul>
Kitozan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prirodna sirovina</li> <li>• dobri rezultati u oblicima prilagođenog oslobađanja lijekova</li> <li>• netoksičan</li> <li>• razgradiv i biokompatibilan</li> <li>• ne uzrokuje alergijske reakcije</li> <li>• primjena u različitim područjima</li> </ul>	-
Etilceluloza	<ul style="list-style-type: none"> <li>• netopljiva u vodi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• netopljiva u probavnom sustavu</li> </ul>
Želatina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prirodna sirovina</li> <li>• jeftina, netoksična i biorazgradiva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• topljiva u vodi</li> </ul>
k-karagenan	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prirodna sirovina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• otapa se samo pri visokim temperaturama (60-80 °C) do koncentracije 2-5 %</li> </ul>
Maltodekstrin	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niska viskoznost pri visokim temperaturama</li> </ul>	-
Škrob	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prirodna sirovina</li> <li>• jeftin, netoksičan i biorazgradiv</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• viskoznost otopine je većinom prevelika za tehnike mikrokapsuliranja</li> </ul>

### **3.4. Ovisnost uspješnosti sušenja o uvjetima uzgoja probiotičkih bakterija**

Važnost fiziologije stanica za uspješno sušenje probiotika pokazano je u brojnim studijama te u tom smislu nekoliko čimbenika ima utjecaj na stabilnost probiotika tijekom dehidracije kao što su stres, faza rasta probiotičke kulture prije dehidracije, sastav medija za rast i genetske modifikacije.

#### **3.4.1 Primjena blagog stresa prije procesa dehidracije**

Primjena subletalnog stresa, kako bi se poboljšao odgovor na stres prije procesa dehidracije, pokazala se kao izvediv pristup, osiguravajući visoku stabilnost bakterijske kulture i zadržavanje fiziološke aktivnosti tijekom dehidracije (de Urreza i de Antoni, 1997). Dokazano je da bakterije reagiraju na promjene u njihovoj neposrednoj okolini metaboličkim reprogramiranjem koji vodi do pojačane rezistencije.

#### **3.4.2 Utjecaj pH i sadržaja kisika na rast probiotičkih bakterija**

Rast bakterijskih kultura odvija se tijekom četiri različite faze, tj lag faza, log faza, stacionarna faza i faza odumiranja. Poznato je da se reakcije bakterijskih kultura na stres razlikuju ovisno o fazi rasta. Bakterije koje ulaze u stacionarnu fazu rasta razvijaju opću otpornost na stres te su stoga više otporne na razne vrste naprezanja (uključujući i naknadnu obradu i skladištenje), nego bakterije u log fazi, zbog nedostatka ugljika i iscrpljenosti, dostupnih izvora hrane koji dodatno izazivaju stres. Stoga je za stabilnost kultura ključna stacionarna faza. Na primjer, objavljeno je da je stacionarna faza stanice *L. rhamnosus* imala najvišu stopu oporavka nakon sušenja (31-50 % preživljavanja), dok je početkom faze ekspanzijskog rasta stanica bilo samo 14 %, dok u lag fazi stanice

pokazuju najvišu osjetljivost i samo preživljavanje je ispod 2 % u sličnim uvjetima sušenja (Corcoran i sur., 2004).

Međutim, u ranijim studijama na mliječno-kiselim bakterijama, u kasnoj eksponencijalnoj fazi ili ranoj stacionarnoj fazi (Carvalho i sur., 2004), zabilježene su slične faze rasta. S druge strane, Saarela i suradnici (2004) su objavili da nisu opažene razlike između zamrzavanja i sušenja te skladištenja u stabilnosti *B. animalis subsp. lactis* stanica u kasnoj eksponencijalnoj fazi rasta (15 sati) ili ranoj stacionarnoj fazi (22 sata). Također pH medija rasta probiotičke kulture utječe na preživljavanje tijekom sušenja. Objavljeno je da je najveća vijabilnost (više od 80 %) bila nakon sušenja zamrzavanjem, kada su *L. reuteri* stanice rasle pri pH 5 i dobivenih nakon 2,5 sata u stacionarnoj fazi (Palmfeldt-Hahn-Hagerdal, 2000).

Pored toga, stanice dobivene u nekontroliranim pH (4,5) uvjetima bile su otpornije na toplinski stres, sušenje raspršivanjem i skladištenje u suhom stanju od onih kultura uz kontrolu pH (6,5) (Silva i sur., 2005). Takva pojava može biti povezana i s adaptacijom na kiseli medij što može promijeniti fiziološko stanje bakterijskih stanica, a što dovodi i do pojačane sinteze proteina te time i poboljšanje otpornosti na sušenje. Silva i suradnici (2005) potvrdili su da je veći otpor *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* koja je rasla pod nekontroliranim pH u korelaciji s pojačanom proizvodnjom proteina toplinskog šoka. Međutim, Linders i suradnici (1997) utvrdili su da je kontrola pH tijekom rasta *L. plantarum* stanica rezultirala višom aktivnošću nakon sušenja (37 % preživjelih) u usporedbi s rastom bez kontrole pH (19 % preživjelih).

Napitci poput voćnih sokova s niskom pH vrijednošću predstavljaju značajan izazov za probiotike. Hood i Zottola (1988) nisu bili u mogućnosti oporaviti stanice *Lactobacillus acidophilus* kulture nakon izlaganja pH 2,0 tijekom 45 minuta, dok nije zabilježeno značajno smanjenje brojnosti stanica izloženih mediju pri pH 4,0 tijekom 2 sata. Goldin i suradnici (1992) su utvrdili slične trendove preživljavanja *Lactobacillus rhamnosus* GG u ljudskom želučanom soku pri pH

vrijednostima između 1,0 i 7,0 (Tripathi i Giri, 2014). Optimalni opseg pH vrijednosti za rast *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* se kreće od 5,5 do 6,0, odnosno od 6,0 do 7,0 (De Vuyst, 2000). Vrste roda *Lactobacillus* u mogućnosti su rasti i preživljavati u fermentiranim proizvodima pri pH vrijednostima između 3,7 i 4,3 (Boylston i sur., 2004). Za vrste roda *Bifidobacterium* je dokazano kako su manje tolerantne te su pH vrijednosti ispod 4,6 štetne za njihovo preživljavanje (Dunne i sur., 2001; Lee i Salminen, 2009). Tolerantnost na kiselinu *Bifidobacterium* vrsta ovisi o korištenom soju vrste i karakteristikama supstrata. Na primjer, *B. longum* najbolje preživljava u prisutnosti kiselina i žučnih soli, dok *B. lactis* najbolje preživljava u fermentiranom mlijeku (Korbekandi i sur., 2011). Sheenan i suradnici (2007) primijetili su znatne razlike prilikom otpornosti na kiseline *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* vrsta jednom kada su bili dodani sokovima od naranče, ananasa i brusnice. Svi sojevi su bolje preživjeli u soku od naranče i soku od ananasa u usporedbi sa sokom od brusnice. Između različitih sojeva, *L. casei*, *L. rhamnosus* i *L. Paracasei* preživjeli su tijekom najmanje 12 tjedana u soku od naranče i ananasa pri pH razinama iznad 6,0 (Tripathi i Giri, 2014). Sniženje pH vrijednosti fermentiranih mesnih proizvoda također predstavlja izazov za preživljavanje probiotika. Sniženje pH vrijednosti od 5,6 do 4,9 nakon fermentacije utječe na preživljavanje probiotika (sojevi *L. rhamnosus* GG i E 97800) u fermentiranoj kobasici (Erkkila i sur., 2001). Nekoliko istraživanja je indiciralo kako je vijabilnost stanica u fermentiranim mesnim proizvodima ovisna o korištenom soju (Kolozyn-Krajewskaa i Dolatowski, 2012). Ranije navedeni rezultati indiciraju kako je upravo izbor soja ključan za razvoj probiotičke hrane. Sadržaj kisika i redoks potencijal su među najvažnijim čimbenicima koji utječu na vijabilnost probiotika osobito tijekom perioda pohrane (Lee i Salminen, 2009). Molekularni kisik je štetan za preživljavanje i rast probiotika jer je većina vrsta anaerobna (De Vuyst, 2000; Holzapfel i sur., 2001). Kisik utječe na probiotike na tri različita načina: (i) izravno je toksičan na neke od stanica; (ii) izvjesne kulture proizvode toksični peroksid u prisutnosti kisika i (iii) slobodni



radikali koji su proizvedeni oksidacijom komponenti (npr. masnoća) su toksični za probiotičke stanice (Korbekandi i sur., 2011).

Razina kisika unutar pakiranja proizvoda tijekom pohrane probiotičkih proizvoda trebala bi biti što je moguće niža kako bi se izbjeglo otrovanje i smrt mikroorganizama odnosno, gubitak funkcionalnosti proizvoda. Stupanj osjetljivosti probiotika na kisik znatno odstupa između različitih vrsta i sojeva probiotika (Talwakar i Kailasapathy, 2003; Talwakar i Kailasapathy, 2004). Bifidobakterije su daleko osjetljivije na oštećenje izazvanim kisikom nego *L. acidophilus* zbog njihove anaerobne prirode. *B. lactis* je vrsta koja je umjereno tolerantna na kisik iz roda *Bifidobacterium*, a koja je izolirana iz fermentiranog mlijeka. Meile i suradnici (1997) potvrdili su ovaj neobičan fenomen ovog soja prilikom ispitivanja osjetljivosti na kisik (Tripathi i Giri, 2014). Općenito, laktobacili su tolerantniji na kisik nego bifidobakterije do mjere kada razina kisika više nije značajna za preživljavanje *Lactobacillus* vrsta. Pored sadržaja određene količine kisika u proizvodu, kisik također prodire kroz pakiranje i dolazi u kontakt s proizvodom. Ovim se značajno smanjuje vijabilnost *L. acidophilus* i *Bifidobacterium* u fermentiranim mliječnim proizvodima.

Dave i Shah (1997) su utvrdili kako bifidobakterija preživljava i tijekom perioda od 35 dana u jogurtu, bez obzira na sadržaj kisika i redoks potencijal jogurta. Čak je i primijećen polagani porast otopljenog kisika u jogurtu, dok je brojnost bifidobakterija ostala iznad preporučene razine od  $10^6$  CFU / g, tijekom roka trajanja jogurta, dok je za *L. acidophilus* utvrđeno kako je brojnost stanica pala ispod  $10^3$  CFU / g, nakon trećeg tjedna od vremena pohrane. Razgradni produkti lipidne peroksidacije pokazuju oštećenje DNA u modeliranom sustavu i bakterijama. Stoga, kako bi minimalizirali oksidaciju i maksimalizirali probiotičku vijabilnost tijekom pohrane, prisutnost antioksidansa u kombinaciji s pohranom u uvjetima vakuuma s kontroliranom aktivnošću vode trebalo bi se pokazati učinkovitim rješenjem (Teixeira i sur., 1995b). Primijenjene su različite

metode kako bi se smanjio sadržaj kisika tijekom pakiranja i pohrane probiotičkih proizvoda. Navedeno uključuje vakuum pakiranje, korištenje materijala za pakiranje s niskom propusnosti za kisik, dodavanje antioksidansa i tvari za uklanjanje kisika, kao i kontroliranjem proizvodnog procesa na takav način, kako bi minimalna količina otopljenog kisika ušla u proizvod (Korbekandi i sur., 2011; Talwalkar i sur., 2004). Antioksidanse poput katehina moguće je koristiti kako bi ograničili negativan učinak izlaganja kisika na bakterije tijekom njihovog rasta i pohrane u proizvodima (Gauderau i sur., 2013).

Autori su izmjerili učinak različitih koncentracija (+) katehina, epigalokatehina galata iz zelenog čaja i ekstrakta zelenog čaja (GTE) na rast probiotičkih sojeva koji su pokazivali različitu senzitivnost na kisik. Dobiveni rezultati su pokazali kako obogaćivanje medija s katehinom nije stimuliralo rast dvaju sojeva bifidobakterija. Ipak, rast *L. helveticus* je bio znatno poboljšán u skladu s aerobnim uvjetima, obogaćivanjem medija s GTE. Slični rezultati su dobiveni dodatkom vitamina E u stabilizacijski matriks, kao antioksidansa koji je poboljšao stabilnost *L. casei* CRL 431 tijekom vremena pohrane od 21 tjedna pri 25 °C (Nag i Das, 2013).

### 3.4.3 Mediji za uzgoj

Sastav medija za rast jedan je od bitnijih čimbenika za stabilnost probiotičkih kultura tijekom sušenja, i u tom pogledu dokazana je važnost prisutnosti ugljikohidrata; na primjer, rast *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* u prisutnosti kriozaštitnih sredstava poput šećera (laktoza, sukroza i trehaloza) ili glicerola (Tripathi i Giri, 2014). Preživljavanje *L. sakei* poboljšano je kada su stanice uzgojene u prisutnosti saharoze (Ferreira i sur., 2005).

Tymcyszyn i suradnici (2007) izvijestili su razlike u utjecaju laktoze, saharoze i trehaloze u oporavku *L. Delbrueckii subsp. bulgaricus* u fazi sušenja u slučaju uzgoja pri različitim

aktivnostima vode. Pokazalo se da se bakterijske stanice prilagođavaju niskim vrijednostima aktivnosti vode. Drugi šećeri, kao što su fruktoza i sorbitol također su pokazali bolju zaštitu od glukoze, standardnog ugljikohidrata za rast (Carvalho i sur., 2004). Studije su pokazale da metaboliti, kao što su manitol, sorbitol i glutamat koji u većini slučajeva ostaju unutar stanice mogu biti odgovorni za određenu stabilnost i preživljavanje.

### 3.5. Rehidracija

Rehidracija suhih probiotičkih kultura je kritični korak za oživljavanje stanica nakon dehidracije. Postupak u vodi može se podijeliti u četiri koraka: vlaženje, uranjanje, dispergiranje i otapanje (Tripathi i Giri, 2014). Rehidracija u smislu osmolarnosti, pH i izvora energije, kao i uvjeta u smislu temperature i volumena može značajno utjecati na stopu preživljenja (Carvalho i sur., 2004b). Za optimalne rezultate, preporučuje se da se stanice suše u stacionarnoj fazi rasta te da se koristi spori postupak rehidracije (Teixeira i sur., 1995a). Poirier i suradnici (1999) su pretpostavili da je povećan oporavak stanica *Saccharomyces cerevisie* postignut kada se stanice suše polagano (7-16 dana) u kontroliranim uvjetima (Tripathi i Giri, 2014). Istraživanja su pokazala da rehidracija medija također može utjecati na stabilnost probiotika. Na primjer u medijima kao što je 10 % (m/V) i RSM PTM medij (1,5 %, m/V, pepton), 1 % (m/V) i 0,5 % triptona (m/V), mesni ekstrakt, kao i 10 % (m/V) otopina saharoze, dobije se značajno bolja stabilnost bakterijskih stanica nego u medijima kao što je fosfatni pufer, natrijev glutamat i voda (Tripathi i Giri, 2014).

### 3.6. Pakiranje proizvoda

Različite vrsta pakiranja poput tipa i debljine materijala za pakiranje, propusnosti za plinove (kisik, ugljični dioksid i vodena para) i svjetlosti koja prodire kroz materijal, tehnologije pakiranja (vakuumsko pakiranje, modificirano pakiranje, aktivni / inteligentni sustavi pakiranja proizvoda) mogu utjecati na preživljavanje probiotika (Korbekandi i sur., 2011).

Temperatura i relativna vlažnost uvjeta okoline mogu utjecati na permeabilnost plinova kroz pakirni materijal i stoga utjecati na vijabilnost (Cruz i sur., 2007). Većina mliječnih probiotika su pohranjeni i prodaju se na tržištu u plastičnom pakiranju koje dopušta visoku propusnost za kisik, ali to predstavlja ozbiljan problem za rast i preživljavanje probiotika.

Vijabilnost *L. acidophilus* u jogurtu koji je pakiran u staklene čašice kao i čašice proizvedene od polietilena visoke gustoće (HDPE) istraživali su Dave i Shah (1997). Razina otopljenog kisika se značajno povećala kod HDPE pakiranja, dok su stakleni spremnici zadržali vijabilnost probiotika pri niskoj razini kisika tijekom 35 dana od pohrane. O kvaliteti staklenih boca za potrebu održavanja vijabilnosti probiotika također su izvijestili Jayamanne i Adams (2004). Autori su koristili posude od gline, plastične i staklene boce kako bi fermentirali i pohranili mlijeko bizona te su utvrdili kako je najviše bifidobakterija preživjelo u staklenim bocama, nakon čega su slijedile plastične boce i posude od gline pri 29 °C. Razlika u vijabilnosti je pripisana permeabilnosti pakiranja koje je omogućilo difuziju kisika unutar posuda. Ipak, suprotno od očekivanog, brojnost bakterija nije proporcionalno odstupala sa stupnjem kristaličnosti pakirnog materijala (Janson i sur., 2002). Miller i suradnici (2002; 2003) koristili su različite laminirane polimerne materijale s izraženim značajkama sprječavanja prodora plinova i kisika uz film ugrađen u pakirni materijal koji je služio vezivanju kisika za potrebu pohrane probiotičkog jogurta. Utvrđene su značajne razlike vrijednosti otopljenog kisika tijekom perioda pohrane istraživanih materijala. Razina kisika

u polistirenskim posudama se povećala od 20 do 40 ppm, dok se razina kisika u laminiranim posudama snizila na 10 ppm nakon 42 dana pohrane u hladnjaku. Najbolji uvjeti za omogućavanje prikladnih anaerobnih uvjeta okoliša (pri manje od 1 ppm kisika) za rast vijabilnih kultura probiotika dobivena je kada je jogurt bio pakiran u posudu s dodanim / integriranim materijalom za zadržavanje kisika uz dodatak agensa koji veže kisik (Miller i sur., 2003; Talwalkar i sur., 2004). Rezultati jasno pokazuju važnost kao i potencijal korištenja kisika za pakiranje probiotičke hrane. Hisiao i suradnici (2004) i Wang i suradnici (2004) istraživali su učinak materijala za pakiranje sa apsorbentom za kisik kao i temperaturu pohrane proizvoda i utjecaj na vijabilnost bifidobakterija uklopljenih u mikrokapsule (Tripathi i Giri, 2014).

Autori su evaluirali uzorke napunjene u poliesterske boce bez kisika, staklene boce i laminirane vrećice tijekom pohrane pri 4 i 25 °C. Brojnost vijabilnih organizama se poboljšala nakon dodatka apsorbenta za kisik i tijekom pohrane pri 25 °C. Ipak, najbolji rezultati su dobiveni kod proizvoda pakiranog u staklene boce i pohranjenog pri 4 °C, sa sniženjem od svega 0,15-0,20 CFU / g nakon 42 dana pohrane. Kudelka (2005) je analizirao učinak tipa pakiranja na kiselost probiotičkog jogurta tijekom 21 dana pohrane u hladnjaku. Uzorci jogurta su pasteurizirani i naknadno napunjeni u plastične (polipropilenske, polistirenske i polietilenske) boce kao i u staklene boce. Jogurt koji je bio pohranjen u polistirensko pakiranje pokazao je najniže vrijednosti kiselosti u usporedbi s drugim tipovima pakiranja, evaluiranim tijekom perioda pohrane (Tripathi i Giri, 2014).

Cruz i suradnici (2013) evaluirali su stabilnost probiotičkog jogurta kojem je dodana glukozna oksidaza i koji je bio pakiran u različite plastične sustave za pakiranje s različitim stopama prijenosa kisika (0,09-0,75 ml kisika / dan).

Plastične posude s nižom stopom permeabilnosti za kisik pokazale su niži sadržaj otopljenog kisika i visoku brojnost probiotičkih bakterija tijekom perioda pohrane u hladnjaku. Pored navedenog,

uzorci su pokazali visok postotak naknadnog zakiseljavanja i stvaranje organskih kiselina. Vrlo niska permeabilnost staklenih boca favorizira preživljavanje probiotičkih kultura.

Ipak, zbog visokih troškova proizvodnje stakla, pored opasnosti pri rukovanju staklenim bocama, proizvođači preferiraju pakirati probiotičke fermentirane proizvode u plastična pakiranja.

U ovom smislu, poželjni su alternativni pristupi, poput vakuum pakiranja, dodataka tvari za apsorpciju kisika, primjene aktivnog pakiranja s materijalom koji onemogućava pristup kisiku što je potrebno sagledati kao potencijalne primjene za pakiranje probiotičkih proizvoda.

### 3.7. Skladištenje

Uvjeti skladištenja tj. temperatura skladištenja, relativna vlažnost, sadržaj kisika te izlaganje svjetlu imaju značajne utjecaje na stabilnost i preživljavanje suhih praškastih oblika probiotika, a optimalni uvjeti skladištenja su neophodni za održavanje njihove stabilnosti. Stabilnost probiotičkih bakterija tijekom skladištenja suhih praškastih oblika obrnuto je povezana s temperaturom skladištenja. Bruno i Shah (2003) pokazali su da je 18 °C optimalna temperatura za dugotrajnu pohranu liofiliziranih probiotika kako bi se povećala održivost bifidobakterija, dok je 20 °C neprikladna temperatura čuvanja. Nadalje, Simpson i suradnici (2005) izvijestili su da je došlo do značajnog smanjenja stabilnosti rodova *Bifidobacterium* kada su sušene u obranom mlijeku i čuvane pri 15 °C i 25 °C. Vijabilnost probiotičkih bakterija tijekom pohrane je u obrnutom odnosu prema temperaturi u uvjetima pohrane proizvoda (Gardiner i sur., 2000).

Proizvode probiotičke hrane trebalo bi pohraniti pri 4-5 °C (Mortazavian i sur., 2007). Najveća vijabilnost primijećena je kod *L. acidophilus* La - 5 u jogurtu tijekom 20 dana pri temperaturi pohrane 2 °C, dok je za *Bifidobacterium lactis* Bb-12, optimalna temperatura pohrane 8 °C (Mortazavian i sur., 2007a; Mortazavian i sur., 2007b). Navedeno je pripisano niskoj rezistentnosti

stanica bifidobakterija pri temperaturi hlađenja u hladnjaku (Korbekandi i sur., 2011). Ipak, u slučaju dugoročno pohranjenih probiotika koji su osušeni liofilizacijom, Bruno i Shah (2003) preporučuju znatno niže temperature (-18 °C) koje maksimaliziraju vijabilnost *Bifidobacterium* vrsta. Pohrana pri 20 °C rezultirala je značajnim smanjenjem broja vijabilnih bakterija ove vrste u suhom praškastom obliku. Slične rezultate postigli su Simpson i suradnici (2005) tijekom pohrane *Bifidobacterium* vrsta pri 15 °C i 25 °C, a koje su osušene sušenjem raspršivanjem. Smanjenje vijabilnosti probiotika kod proizvoda koji sadrže šećer tijekom pohrane pri visokim temperaturama i / ili relativnoj vlažnosti zraka jest u vezi s njihovom prijelaznom temperaturom (Tripathi i Giri, 2014). Sadržaj vlage ključan je čimbenik koji utječe na stabilnost i rok valjanosti živih bakterija. Sadržaj vlage kod probiotičkih proizvoda jest drugi čimbenik koji utječe na stabilnost živih bakterija tijekom preporučenog vremena uporabe proizvoda. Pohrana u prisustvu kisika i vlage štetna je za preživljavanje bakterija (Onneby i sur., 2013). Količina vode koja preostaje nakon sušenja (ostatna vlaga) ne utječe samo na vijabilnost probiotičke bakterije i njezine karakteristike odmah nakon procesa, već i na stopu gubitka vijabilnosti tijekom ponovnog pohranjivanja. Optimalna količina ostatne vlage za pohranu *L. salivarius subsp. salivarius* nakon sušenja zamrzavanjem u rasponu je od 2,8 % do 5,6 % (Zayed i Roos, 2004). Weinbreck i suradnici (2010) izvijestili su da je aktivnost vode od 0,7 rezultirala smanjenjem za 10 ciklusa vijabilne brojnosti *L. rhamnosus* GG nakon 2 tjedna pohrane. Hoobin i suradnici (2013) pokazali su kako su karakteristike primanja vlage i molekularna mobilnost sastava matriksa u suprotnosti relativnoj vlazi u okolišu i bolje su odrednice probiotičke vijabilnosti tijekom pohrane. Smanjenje stabilnosti tijekom skladištenja odnosi se na oksidaciju membranskih lipida (Teixeira i sur., 1996).

#### 4. RASPRAVA

Probiotici su definirani kao jedna ili više živih stanica mikroorganizama koji primijenjeni u ljudi i životinja djeluju korisno na domaćina poboljšavajući svojstva autohtone crijevne mikroflore (Šušković, 2001). Današnja populacija svjesna je važnosti ispravne prehrane pa postoji veliki interes primjene probiotika kao funkcionalnih dodataka hrani, osobito u fermentiranim mliječnim proizvodima (Capela i sur., 2006; Šušković, 2009).

Mogućnost biotehnološke proizvodnje i primjene probiotika kao živih lijekova u središtu su znanstvenih istraživanja. No, da bi polučili željene pozitivne učinke na zdravlje, probiotički pripravci moraju sadržavati žive mikrobne stanice u koncentracijama višim od  $10^6$  po gramu proizvoda (Shah, 2007). Liofilizacija je jedna od najpogodnijih metoda izrade suhih praškastih oblika probiotika za industrijsku primjenu kroz duži vremenski period. Međutim, preživljavanje probiotika tijekom procesa liofilizacije razlikuje se ovisno o bakterijskoj vrsti zbog različitih fizikalno-kemijskih karakteristika površine bakterijskih stanica (Capela i sur., 2006). Kako bi se poboljšalo preživljavanje probiotika, tijekom liofilizacije se primjenjuju različiti lioprotektori, među kojima najčešće glicerol.

Mnogi znanstveni radovi opisuju učinkovitost metoda uklapanja u mikrokapsule te povećanje stabilnosti i stupnja preživljavanja tijekom proizvodnje, čuvanja i primjene probiotika pri stresnim uvjetima tijekom procesiranja hrane, no i nakon oralne primjene, tijekom prolaska kroz probavni sustav (Capela i sur., 2006; Gbassi i sur., 2009). Radi očuvanja dugoročne stabilnosti i funkcionalnosti probiotika, biotehnološka industrija koristi različite postupke sušenja koji uključuju prelazak mikroorganizama iz tekućeg u čvrsto agregatno stanje. Nekoliko je radova



pokazalo da pravilno osušeni mikroorganizmi ostaju održivi tijekom dugotrajnog skladištenja pri sobnoj temperaturi (Zayed i Roos, 2004).

Rezultati prikazani u brojnim radovima potvrđuju da procesi sušenja utječu na integritet stanica i na stanične membrane. Visoki gubitak kultiviranja uvijek odgovara visokom porastu propusnosti stanica. To potvrđuje ulogu integriteta membrane u bakterijskoj kultiviranosti i veliku korelaciju između ova dva markera održivosti.

Sušenje raspršivanjem je relativno jeftina tehnologija, brza i ponovljiva u usporedbi s drugim tehnikama uklapanja u mikrokapsule. Proces je fleksibilan, nudi znatne varijacije u matrici, može se prilagoditi i proizvodi čestice dobre kvalitete. U jednom od objavljenih radova istraživao se utjecaj tri standardna procesa sušenja (sušenje liofilima, sušenje zrakom i sušenje raspršivanjem) na svojstva stanica triju bakterijskih vrsta (*Lactobacillus plantarum*, *Bifidobacterium bifidum* i *Lactobacillus zeae*) (Ebel i sur., 2011; Kechaou i sur., 2013). Bakterijski soj čija je kultiviranost najmanje bila pod utjecajem je *L. plantarum* (između 0 i 1 log CFU / ml). Pokazalo se da je vrsta *Bifidobacterium* osjetljivija na proces sušenja zrakom koji je izazvao pad broja kolonija na 2,0 log CFU / ml, za razliku od sušenja zamrzavanjem i umjerenih gubitaka od 1,0 i 0,5 log CFU / ml. *L. zeae* je bio najosjetljiviji bakterijski soj: tri procesa sušenja uzrokovala su pad broja kolonija na 1,5 log CFU / ml. Utvrđeno je da je proces sušenja zrakom izazvao veliko smanjenje enzimske aktivnosti svih bakterija (do manje od 25 % osnovne enzimatske razine aktivnosti), čak i kada je uočen nizak gubitak kultiviranja (za *L. plantarum*). Međutim, razina aktivnosti esteraze izmjerena nakon sušenja zamrzavanjem i sušenja raspršivanjem bila je veća u korelaciji s rezultatima za bakterijsku kultiviranost. Proces sušenja zamrzavanjem izazvao je najveće zakašnjenje u oporavku rasta, dok je sušenje raspršivanjem uzrokovalo najkraće kašnjenje.

Utjecaj sušenja zrakom ovisio je o bakterijskom soju. Sušenje zrakom uzrokovalo je najveće kašnjenje u oporavku rasta *L. zae*, dok je kašnjenje kraće za *B. bifidum* i *L. plantarum*.

Rezultati samo potvrđuju da procesi sušenja utječu na integritet stanica i na stanične membrane. Količina energije potrebna za uklanjanje vode je vrlo slična u sve tri tehnike sušenja. Međutim, vrijeme potrebno za uklanjanje vode poprilično varira. Snaga koja se koristi tijekom sušenja raspršivanjem je najmanje 10 000 puta veća od one tijekom sušenja zamrzavanjem (istu energiju se raspršuje u nekoliko sekundi u usporedbi s nekoliko sati procesa). To bi moglo objasniti zašto sušenje zamrzavanjem obično proizvodi bolje stope preživljavanja stanica. Doista, proces sušenja zamrzavanjem, bez zaštitnih sredstava, dao je najbolje rezultate za enzimatsku aktivnost i integritet stanica za sve tri bakterije. Proces sušenja zrakom ima najveći učinak na sve markere održivosti (bakterijski integritet, enzimatsku aktivnost i obradivost) u sve tri bakterije.

Međutim, čini se da proces sušenja zrakom ima manji utjecaj na oporavak rasta bakterija u usporedbi sa sušenjem zamrzavanjem, a udio preživjelih bakterija je u stanju održati visoku stopu rasta. Visoki utjecaj sušenja zamrzavanjem na oporavak rasta bakterija može se objasniti razlikom u stresu u usporedbi sa sušenjem zrakom i sušenjem raspršivanjem.

Nasuprot tome, sušenje zrakom i sušenje raspršivanjem uključuju osmotski i oksidativni stres. Također su se istraživali učinci sušenja bez zaštitnih sredstava na *in vitro* bakterijsku fiziologiju i na probiotičku funkcionalnost. Utvrđeno je da različiti procesi sušenja snažno utječu na probiotičku održivost i funkcionalnost. Učinci dehidracijskih tretmana na funkcionalnost stanica nisu izravno povezani s preživljavanjem stanice, a svaki bakterijski soj ima specifičnu osjetljivost na svaku od stabilizacijskih metoda. Također je otkriveno da postupci sušenja mogu pozitivno ili negativno mijenjati svojstva bakterija.

Sušenje zamrzavanjem dalo je najbolju metodu očuvanja bakterijske kultivacije, hidrofobnosti i enzimske aktivnosti, ali je uzrokovalo značajno kašnjenje rasta.

Sušenje zrakom imalo je sličan utjecaj na bakterijsku funkcionalnost, ali je uzrokovalo veće pogoršanje različitih markera stanične održivosti.

## **5. ZAKLJUČAK**

Fermentirani i nefermentirani mliječni proizvodi obogaćeni probiotičkim bakterijama su se razvili u uspješnu kategoriju funkcionalne hrane, te je u tom smislu izuzetno bitna stabilnost i dostupnost suhih oblika probiotika za njihovu raširenu primjenu. Metode proizvodnje suhih probiotičkih oblika trebaju biti takve da održavaju i osiguravaju stabilnost te odgovarajući broj bakterija nakon proizvodnje. Metode sušenja zamrzavanjem i sušenja raspršivanjem mogu se koristiti za proizvodnju suhih praškastih oblika probiotika u velikim količinama, ali ti procesi rezultiraju izlaganjem živih probiotičkih bakterija različitim stresovima, kao što su toplina, hladnoća, kisik i osmotski stres, što može dovesti do smanjene funkcionalnosti te gubitka stabilnosti tijekom sušenja i skladištenja. Za najbolje rezultate važno je uzeti u obzir niz čimbenika, uključujući i odabir probiotičkog soja, stanje kulture, korištenje zaštitnih sredstava i aktivnost vode. Uklapanje u mikrokapsule eksponencijalno je povećano tijekom posljednja dva desetljeća, kao i broj objavljenih publikacija povezanih s tehnikama sušenja. Vjeruje se da će se značajni iskoraci u ovom području nastaviti s porastom broja novih industrijskih procesa te prevladavanjem svih industrijskih ograničenja i ispunjavanjem zahtjeva. Budući da se potrošnja probiotičkih proizvoda povezuje s pozitivnim učincima, buduća klinička ispitivanja trebala bi dati još bolji uvid u ulogu imobiliziranih probiotičkih mikroorganizama u svrhu promicanja ljudskog zdravlja. U međuvremenu, farmaceutska i prehrambena industrija trebale bi prevladati teškoće uklapanja u mikrokapsule i iznaći načine iskorištavanja prednosti suvremenih tehnologija sušenja.

## 6. LITERATURA

Albadran, H. A., Chatzifragkou, A., Khutoryanskiy, V. V., Charalampopoulos, D. (2015). Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. *Food Research International*, 74, 208-216.

Anal, A. K., Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 240-251.

Ananta, E., i Knorr, D. (2003). Pressure-induced thermotolerance of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Food Research International*, 36, 991-997.

Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 15, 399-409.

Anekella, K. I Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 17-24.

Aranaz, I., Mengibar, M., Harris, R., Panos, I., Miralles, B., Acosta, N. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203e230, (<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/ccb/2009/00000003/00000002/art00009>) (pristupljeno 15.10.2017.)

Barbosa, J., Borges, S., Amorim, M., Pereira, M. J., Oliveira, A., Pintado, M.E., Teixeira, P., (2015). Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. *Journal of Functional Foods*, 17, 340-351.

Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., Reinheimer, J.A. (2004). Incorporation of *Bifidobacteria* into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14, 375-387.

Capela, P., Hay, T. K. C. Shah, N. P. (2006). Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, 39, 203-211.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2002). Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24, 1587-1591.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2004a). Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, 20, 248-254.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2003). Effect of various factors upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Science*, 68, 2538-2541.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X., Gibbs, P. (2004b). Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 835-847.

Champagn, C. P., Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185-193.

Champagne, C. P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for them proved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 184-190.

Chen, M., Mustapha, A. (2012). Survival of freeze-dried microcapsules of alpha-galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology*, 30, 68-73.

Conrad, P. B., Miller, D. P., Cielenski, P. R., de Pablo, J. J. (2000). Stabilization and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, 41, 17-24.

Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024-1039.

Corcoran, B. M., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005). Survival of probiotic *Lactobacilli* in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3060-3067.

Cruz, A. G., Castro, W. F., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A., Celeghini, R. M. S., Raices, R. S. L., Oliveira, C. A. F., Freitas, M. Q., Conte Júnior, C. A., Mársico, E. T. (2013). Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Research International*, 51, 723-728.

De Vuyst, L. (2000). Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 38, 105-112.

Desmond, C., Ross, R. P., O'Callaghan, E., Fitzgerald, G., Stanton, C. (2002). Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 1003-1011.

Dunne, C., O' Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: Correlation with *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 386-392.

Dürriegl, M. (2011) Priprava čvrstih disperzija za kontrolirano oslobađanje lijeka metodom sušenja raspršivanjem. Doktorski rad. Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Ebel, B., Martin, F., Le, L., Gervais, P., Cachon, R. (2011). Use of gases 560 to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential 561 in fermented milk. *Journal of Dairy*

*Science*, 94, 2185-2191.

Erkkila, S., Suihko, M. L., Eerola, S., Petaja, E., Mattila- Sandholm, T. (2001). Dry fermented sausages by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 205-210.

Estevinho, B. N., Rocha, F., Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications. *Trends in Food Science & Technology*, 31, 138-155.

Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzoti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 82, 59-70.

Ferreira, V., Soares, V., Santos, C., Silva, J., Gibbs, P. A., Teixeira, P. (2005). Survival of *L. sakei* during heating, drying and storage in the dried state when growth has occurred in the presence of sucrose or monosodium glutamate. *Biotechnology Letters*, 27, 249-252.

Fonseca, F., Beal, C., Corrieu, G. (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *Journal of Dairy Research*, 67, 83-90.

Fowler, A., Toner, M. (2005). Cryo-injury and biopreservation. *Annals of New York Academy of Sciences*, 1066, 119-135.

Franjione, J., Vasishtha, N. (1995). The Art and Science of microencapsulation, *Technology Today*. Southwest Research Institute.

Gardiner, G. E., O'Sullivan, E., Kelly, J., Auty, M. A., Fitzgerald, G. F., Collins, J. K. (2000). Comparative survival rates of human derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray-drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2605-2612.

Gaudreau, H., Champagne, C. P., Remondetto, G. E., Bazinet, L., Subirade, M. (2013). Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. *Food Research International*, 53, 751-757.

Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., Marchioni, N. (2009) Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins *International Journal of Food Microbiology*, 129, 103-105.

Gupta, S., Abu-Ghannam, N. (2012). Probiotic fermentation of plant based products: Possibilities and opportunities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 183-199.

Heidebach, T., Forst, P., Kulozik, U. (2009). Transglutaminase-induced caseinate gelation for microencapsulation of probiotic cells. *International Dairy Journal* 19, 77-84.

Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of*

*Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.

Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaouc, N., Chain, F., Bermudez-Humaran, L. G., Langella, P., Gervais, P., Beney, L. (2015). Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of Biotechnology*, 214, 17-26.

Janson, S. E. A., Gallet, G., Heft, T., Karlsson, S., Gedde, U. W., Hendenqvist, M. (2002). Packing materials for fermented milk: Solute-induced changes and effects of material polarity and thickness on food quality. *Packaging Technology and Science*, 15, 287-300.

Kailasapathy, K. (2002). Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 3, 39-48.

Kechaou, N., Chain, F., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bertho, N., Chevalier, C., Le Goc, R., Courau, S., Molimard, P., Chatel, J. M. (2013). Identification of one novel candidate probiotic *Lactobacillus plantarum* strain active against Influenza virus infection in mice by a large-scale screening. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 1491-1499.

Kołożyn-Krajewskaa, D., Dolatowski, Z. J. (2012). Probiotic meat products and human nutrition. *Process Biochemistry*, 47, 1761-1772.

Korbekandi, H., Mortazavian, A. M., Iravani, S. (2011). Technology and stability of probiotic in fermented milks. In N. Shah, A. G. Cruz, Faria, J. A. F. (Eds.), Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health (str. 131-169). NewYork: Nova Science Publishers.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.

Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 114, 737-743.

Kuraishi, C. Sakamoto, J., Yamazaki, K., Susa, Y., Kuhara, C., Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62, 488-490.

Lee, Y. K., Salminen, S. (2009). Handbook of probiotics and prebiotics. 2 izdanje. Hoboken, NJ: JohnWiley and Sons, Inc.

Heydari, S., Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mohammadifar, M. A., Ezzatpanah, H. (2011). Biochemical, microbiological and sensory characteristics of probiotic yoghurt containing various prebiotic compounds. *Italian Journal of Food Science*, 23, 153-163.

Liu, H., Gong, J., Chabot, D., Miller, S. S., Cui, S. W., Ma, J. G., Zhong, F., Wang, Q. (2015). Protection of heat-sensitive probiotic bacteria during spray-drying by sodium caseinate stabilized



fat particles. *Food Hydrocolloid*, 51, 459-467.

Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. (2001). Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1-2), 1-17.

Lucas, A., Sodini, I., Monnet, C., Jolivet, P., Corrieu, G. (2004). Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal*, 14, 47-53.

Mattila, T., Saarela, M. (2000). Probiotic functional foods. In Williams i R. G. Gibson (Eds.), *Functional foods* (str. 287-313). New York: CRC Press LLC.

Meng, X. C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Daly, C. i Ross, R. P. (2008). Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, 106, 1406-1416.

Miller, C. W., Nguyen, M. H., Rooney, M., Kailasapthy, K. (2002). The influence of packaging materials on the dissolved oxygen content of probiotic yogurt. *Packaging Technology and Science*, 15, 133-138.

Miller, C. W., Nguyen, M. H., Rooney, M., Kailasapthy, K. (2003). The control of dissolved oxygen content in probiotic yogurts by alternative packing materials. *Packaging Technology and Science*, 16, 61-67.

Mohammadi, R., Mortazavian, A. M. (2011). Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. *Food Reviews International*, 27, 192-212.

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183-193.

Mortazavian, A. M., Ehsani, M. R., Mousavi, S. M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J. (2007a). Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 123-127.

Mortazavian, A. M., Khosrokhvar, R., Rastegar, H., Mortazaei, G.R. (2010). Effects of dry matter standardization order on biochemical and microbiological characteristics of freshly made probiotic Doogh (Iranian fermented milk drink). *Italian Journal of Food Science*, 22, 98-102.

Mortazavian, A. M., Razavi, S. H., Ehsani, M. R., Sohrabvandi, S. (2007b). Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5, 1-18.

Nag, A., Das, S. (2013). Improving ambient temperature stability of probiotics with stress adaptation and fluidized bed drying. *Journal of Functional Foods*, 5, 170-177.

Önneby, K., Pizzul, L., Bjerketorp, J., Mahlin, D., Hakansson, S., Wessman, P. (2013). Effects of di- and polysaccharide formulations and storage conditions on survival of freeze dried *Sphingobium* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1399-1408.

Palmfeldt, J., Hahn-Hagerdal, B. (2000). Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 235-238.

Runjić-Perić, V. (1996). Kultiviranje združenih bakterija mliječne kiseline za silažne starter kulture. Doktorski rad. Zagreb. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2006). Effect of carbohydrates on the survival of *Lactobacillus helveticus* during vacuum drying. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 271-276.

Santivarangkna, C., Kulozik, U., Foerst, P. (2007). Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnology Progress*, 23, 302-315.

Shah, N. P., Cruz, A. G. i Faria, J. A. F. (2011). Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health, 131-169. New York, Nova Science.

Shah, N. P. (2002). The exopolysaccharides production by starter cultures and their influence on textural characteristics of fermented milks. *International Dairy Federation*, 101-115.

Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal of Dairy Science*, 83, 894-907.

Shah, N. P., Ravula, R. (2004). Selling the cells in desserts. *Dairy Industries International*, 69, 31-32.

Silva, J., Carvalho, A. S., Ferreira, R., Vitorino, R., Amado, F., Domingues, P. (2005). Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* to stress conditions during spray-drying. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 775-782.

Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. (2005). Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray-drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 493-501.

Snydman, D. R. (2008). The safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 46, 104-111.

Šušković, J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. Doktorski rad. Zagreb. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković, J. (2009) Probiotici kao živi lijekovi, predavanje iz kolegija "Probiotici i starter kulture", Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 227-235.

Šušković, J., Krobot, M., Mehak, M., Matošić, S. (1993). Antimikrobna aktivnost *Lactobacillus acidophilus*. *Mljekarstvo*, 43, 95-106.

Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2003). A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 117-124.

Talwalkar, A., Kailasapathy, K. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 5, 1-8.

Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K., Nguyen, M. H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 605-611.

Teixeira, P., Castro, H., Kirby, R. (1995a). Spray-drying and a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, 78, 456-462.

Teixeira, P., Castro, H., Kirby, R. (1996). Evidence of membrane lipid oxidation of spray-dried *Lactobacillus bulgaricus* during storage. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 34-38.

Teixeira, P., Castro, H., Malcata, F. X., Kirby, R. M. (1995b). Survival of *Lactobacillus delbrueckii spp. bulgaricus* following spray-drying. *Journal of Dairy Science*, 78, 1025-1031.

Teixeira, P., Castro, H., Mohacsi-Farkas, C., Kirby, R. (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 219-226.

Tripathi, M. K., Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241.

Tymczyszyn, E. E., Gomez-Zavaglia, A., Disalvo, E. A. (2007). Effect of sugars and growth media on the dehydration of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 845-851.

Wang, Y. C., Yu, R. C., Chou, C. C. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soy milk after drying, subsequent rehydration and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 93, 209-217.

Weinbreck, F., Bodnár, I., Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136, 364-367.

Zayed, G., Roos, Y. H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze drying and storage. *Process Biochemistry*, 39, 1081-1086.

## KRATICE

BMK	Bakterije mliječne kiseline
CFU	Broj koloniziranih bakterija /ml
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina
GTE	Ekstrakt zelenog čaja
HDPE	Polietilen visoke gustoće
LAB	Laktobacili
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid
PTM	Pepton, tripton, mesni ekstrakt
RNA	Ribonukleinska kiselina
RSM	Rekonstituirano obrano mlijeko